

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Étude de la fonction rénale, de l'implication des adipokines et de l'influence du genre dans un modèle murin d'obésité

Wilkin, Chloé

*Award date:*  
2017

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**Faculté des Sciences**

**ÉTUDE DE LA FONCTION RÉNALE, DE L'IMPLICATION DES ADIPOKINES ET DE  
L'INFLUENCE DU GENRE DANS UN MODELE MURIN D'OBÉSITÉ**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Chloé Wilkin

Janvier 2017

Promoteur : CARON Nathalie

Tuteur : MARTIN Blanche

Laboratoire de physiologie, URPhyM, Université de Namur, Namur, Belgique

## **Étude de la fonction rénale, de l'implication des adipokines et de l'influence du genre dans un modèle murin d'obésité**

WILKIN Chloé

### Résumé

Au cours des dernières décennies, l'incidence de l'obésité a considérablement augmenté, résultant d'un mode de vie sédentaire et une alimentation déséquilibrée. Cette maladie métabolique, identifiée comme un facteur de risque pour le développement et la progression de l'insuffisance rénale chronique, est maintenant considérée comme un problème majeur de santé publique. En cas d'obésité, le tissu adipeux va, d'une part, augmenter sa fonction de stockage et, d'autre part, va voir sa fonction endocrine perturbée. En effet, il a été montré que lors de cette pathologie, la sécrétion d'adipokines était altérée. Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à trois adipokines en particulier : l'adiponectine, la leptine et la chémérine, et nous avons tenté de mieux comprendre 1) leur rôle dans la progression de l'obésité, 2) leur impact sur les altérations rénales ainsi que 3) l'influence du genre sur ces paramètres. Pour ce faire, des souris C57Bl/6 mâles et femelles ont été nourries pendant 16 semaines avec un régime pauvre en graisse (LFD), un régime riche en graisse (HFD) ou un régime riche en graisse associé à l'ajout de fructose dans l'eau de boisson (HFDF). Les souris mâles et femelles, HFD et HFDF, ont développé un syndrome d'obésité, illustré par une augmentation significative du poids corporel, une hypertrophie des reins et du foie ainsi que le développement d'une résistance à l'insuline. Une modeste déficience de la fonction rénale a été observée chez les souris HFD et HFDF, malgré le développement d'altérations morphologiques dans le tissu rénal, notamment caractérisées par une glomérulosclérose. En revanche, les souris femelles semblent être protégées de certaines de ces altérations morphologiques. De plus, à l'exception de la leptine, les profils d'expression des adipokines étudiées ainsi que de leur récepteurs ne diffèrent que légèrement entre les groupes expérimentaux. De façon intéressante, le genre semble influencer ces profils d'expression. Enfin, les souris nourries mâles HFD et HFDF présentent une inflammation, un stress oxydatif et une fibrose modérée au sein du tissu rénal. En revanche, les souris femelles présentent des réponses inflammatoire et fibrotique rénales plus importantes, mais semblent moins sujettes au stress oxydatif. En résumé, malgré une faible altération de la fonction rénale, ces résultats suggèrent un impact du régime alimentaire sur l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose rénale, alors qu'il exerce une influence modérée sur les adipokines étudiées, à l'exception de la leptine. De plus, le genre influence significativement les résultats obtenus, mettant en lumière l'importance des hormones sexuelles dans les mécanismes physiopathologiques de l'obésité.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2017

**Promoteur:** Nathalie CARON

## Remerciements

---

Je voudrais commencer par dire que ce mémoire fut une des expériences la plus enrichissante de toute ma vie. Il m'a fait progresser aussi bien en tant que scientifique et chercheur qu'en tant que personne.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, M. Arnould, M. Bihin, M. Masereel et Mme. Minet, pour le temps qu'ils auront consacré à la lecture et à l'évaluation de ce mémoire. Je tiens également à remercier Mme. Nathalie Caron de m'avoir permis de réaliser mon mémoire au sein de son laboratoire, tout en me laissant assez de liberté pour m'épanouir professionnellement. Je la remercie également pour les corrections et le temps qu'elle a dédié à mon mémoire.

Je souhaiterais remercier comme il se doit Blanche, Inès et Olivia, même si les mots ne seront jamais à la hauteur de ma pensée. Commençons par Blanche, merci pour tout ce que tu m'as apporté, merci pour ta bonne humeur quotidienne et ta gentillesse envers moi. Merci de m'avoir remonté le moral lorsque les résultats n'étaient pas au rendez-vous ou que rien ne fonctionnait (Western blot quand tu nous tiens !). Je voudrais te remercier pour ta disponibilité de chaque instant, pour toute l'énergie que tu as dépensé pour moi, tes encouragements et tes conseils lors de ma rédaction. Je suis heureuse d'avoir été ta première mémorante. Inès, pour une fois tu auras des remerciements dignes de ce nom ! Je souhaiterais te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ton franc parlé, pour tes conseils et tes corrections. J'ai adoré discuter avec toi lorsqu'on était toutes les deux. Tu m'as appris beaucoup, aussi bien sur mon travail que sur moi-même, et je te remercie de tout cœur pour cela. Merci à Olivia pour tout le travail que tu as effectué avec et pour moi. Merci pour ton rire si communicatif et tous tes petits bruits, réflexions et commentaires qui n'ont pas manqué de me faire rire. Merci aussi pour les encouragements et l'aide que tu m'as apporté à chaque instant. Je n'oublie pas non plus Vanessa, qui aura partagé la moitié de ce mémoire à nos côtés. Merci pour ta joie de vivre, tes petites histoires et tous le temps que tu m'auras consacré pour les corrections, mais aussi tes petits conseils, et ce, même après ton départ. Vous êtes des personnes avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à parler, à partager ma vie, mes anecdotes. Alors je vous remercie d'avoir été à mon écoute, merci à toutes pour les rires et tous les bons moments que vous m'avez fait passer au cours de ces dix derniers mois, qui ont passés si vite ! La fin d'une histoire est le commencement d'une autre, mais j'espère sincèrement pouvoir continuer cette belle aventure que j'ai commencé avec vous.

Je voudrais également remercier mes amies Camille et Louise qui m'auront accompagné tout au long de ces cinq belles années. Nous avons connu des hauts et des bas, mais au final il ne reste que les bons moments. J'espère de tout cœur que nous resterons en contact, même si selon Camille « c'est plus compliqué de me voir que le ministre ».

Pour terminer, je tiens à remercier ma famille de m'avoir supporté pendant mes blocus. Merci de vous être aussi bien occupé de moi dans mes moments de doutes et de vos encouragements, sans vous je n'y serais jamais arrivée.



## Liste des abréviations

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| µg                            | Microgramme                               |
| µL                            | Microlitre                                |
| µm                            | Micromètre                                |
| µmol                          | Micromole                                 |
| ACE                           | Enzyme de conversion de l'angiotensine    |
| AdipoR1                       | Adiponectin Receptor 1                    |
| AdipoR2                       | Adiponectin Receptor 2                    |
| ADN                           | Acide désoxyribonucléique                 |
| ADNc                          | Acide désoxyribonucléique complémentaire  |
| ANOVA II                      | Two-way analysis of variance              |
| APS                           | Persulfate d'ammonium                     |
| ARNase                        | Ribonucléase                              |
| ARNm                          | Acide ribonucléique messenger             |
| BUN                           | Blood Urea Nitrogen                       |
| CCRL2                         | Chemokine (CC motif) receptor-like 2      |
| CMKLR1                        | Chemokine-like receptor-1                 |
| Cre                           | Créatinine                                |
| DAB                           | Diaminobenzidine                          |
| DFG                           | Débit de filtration glomérulaire          |
| dL                            | Décilitre                                 |
| dNTP                          | Déoxyribonucléotide triphosphate          |
| DTT                           | Dithiothréitol                            |
| ELISA                         | Enzyme-linked immunosorbent assay         |
| FDP                           | Freezing point depression                 |
| FFA                           | Acide gras libre                          |
| g                             | Gramme                                    |
| GAPDH                         | Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |
| GPR1                          | G protein-coupled receptor-1              |
| h                             | Heure                                     |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peroxyde d'hydrogène                      |
| HDL                           | High-Density Lipoprotein                  |
| HFD                           | High-Fat Diet                             |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| HFDF                             | High-Fat Diet Fructose                 |
| HPLC                             | High Performance Liquid Chromatography |
| HRP                              | HorseRadish Peroxidase                 |
| ICAM                             | Intercellular Adhesion Molecule        |
| IL-10                            | Interleukine-10                        |
| IL-1 $\beta$                     | Interleukine-1 $\beta$                 |
| IL-6                             | Interleukine-6                         |
| IMC                              | Indice de masse corporelle             |
| IR                               | Insuffisance rénale                    |
| ISOM                             | Inner Stripe of the Outer Medulla      |
| Kg                               | Kilogramme                             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Potassium phosphate monobasic          |
| L                                | Litre                                  |
| LepR                             | Leptin Receptor                        |
| LFD                              | Low-Fat Diet                           |
| m                                | Mètre                                  |
| M                                | Molaire                                |
| MCP-1                            | Monocyte chemoattractant protein-1     |
| MEC                              | Matrice extracellulaire                |
| MetS                             | Syndrome métabolique                   |
| mg                               | Milligramme                            |
| ml                               | Millilitre                             |
| mm                               | Millimètre                             |
| mm <sup>2</sup>                  | Millimètre carré                       |
| mOsm                             | Milliosmole                            |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Hydrogénophosphate de sodium           |
| NaCl                             | Chlorure de sodium                     |
| ng                               | Nanogramme                             |
| NK                               | Natural Killer                         |
| nm                               | Nanometre                              |
| nM                               | Nanomolaire                            |
| nmol                             | Nanomole                               |
| NOX                              | NADPH oxidase                          |
| NS                               | Non significatif                       |
| OMS                              | Organisation Mondiale de la Santé      |

|                |   |
|----------------|---|
| OSOM           | Outer Stripe of the Outer Medulla                   |
| PA-1           | Plasminogen activator inhibitor-1                   |
| PAS            | Acide Périodique de Schiff                          |
| PBS            | Phosphate saline buffer                             |
| PC             | Poids corporel                                      |
| PCR            | Polymerase chain reaction                           |
| PPAR- $\gamma$ | Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ |
| PVDF           | Polyvinylidène fluoride                             |
| RARRES2        | Retinoic acid receptor responder protein 2          |
| RI             | Résistance à l'insuline                             |
| ROS            | Espèce réactive de l'oxygène                        |
| rpm            | Rotations par minute                                |
| RT             | Reverse Transcriptase                               |
| RT-PCR         | Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction     |
| RT-qPCR        | PCR quantitative en temps réel                      |
| SDS            | Sodium Dodecyl Sulfate                              |
| SEM            | Erreur standard de la moyenne                       |
| SRA            | Système rénine-angiotensine                         |
| SRAA           | Système rénine-angiotensine-aldostérone             |
| TA             | Tissus adipeux                                      |
| TAB            | Tissu adipeux blanc                                 |
| TEMED          | Tétraméthyléthylènediamine                          |
| TGF- $\beta$   | Transforming Growth Factor- $\beta$                 |
| TIG2           | Tazarotene-induced gene protein 2                   |
| TNF- $\alpha$  | Tumor Necrosis Factor $\alpha$                      |
| VCAM           | Vascular cell adhesion molecule                     |
| VLDL           | Very Low-Density Lipoprotein                        |
| vs             | Versus  |

## Table des matières

### INTRODUCTION

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | Généralités sur le rein.....                     | 1  |
| 1.1.     | Anatomie et histologie rénale .....              | 1  |
| 1.2.     | Régulation de la fonction rénale.....            | 5  |
| 2.       | L'insuffisance rénale .....                      | 6  |
| 3.       | L'obésité.....                                   | 7  |
| 3.1.     | Généralités .....                                | 7  |
| 3.2.     | Le syndrome métabolique .....                    | 8  |
| 3.2.1.   | La résistance à l'insuline (RI) .....            | 11 |
| 3.2.2.   | Obésité ou adiposité viscérale .....             | 11 |
| 3.2.3.   | Dyslipidémie athérogénique.....                  | 12 |
| 3.2.4.   | Hypertension .....                               | 12 |
| 3.3.     | Inflammation .....                               | 12 |
| 3.4.     | Effet du genre sur l'obésité.....                | 14 |
| 3.5.     | Maladies rénales associées à l'obésité.....      | 14 |
| 3.6.     | Adipo(cyto)kines .....                           | 16 |
| 3.6.1.   | Chémérine .....                                  | 17 |
| 3.6.1.1. | Chémérine et obésité.....                        | 18 |
| 3.6.1.2. | Chémérine, inflammation et stress oxydatif ..... | 19 |
| 3.6.1.3. | Chémérine et maladies rénales.....               | 20 |
| 3.6.2.   | Adiponectine .....                               | 20 |
| 3.6.3.   | Leptine.....                                     | 22 |
| 4.       | Objectifs du mémoire .....                       | 23 |

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Animaux .....  | 24 |
| 2.     | Fonction rénale et données métaboliques.....         | 25 |
| 3.     | Échantillons biologiques .....                       | 26 |
| 4.     | Analyses histologiques et immunohistochimiques ..... | 26 |
| 4.1.   | Prétraitements .....                                 | 26 |
| 4.2.   | Histologie.....                                      | 27 |
| 4.2.1. | Coloration au PAS.....                               | 27 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.2.2. | Coloration au rouge picrosirius .....                          | 28 |
| 4.3.   | Immunohistochimie .....  | 28 |
| 5.     | Analyse des échantillons biologiques .....                     | 29 |
| 5.1.   | Concentration en urée plasmatique.....                         | 29 |
| 5.2.   | Concentration en créatinine plasmatique et urinaire .....      | 30 |
| 5.3.   | Concentration urinaire en albumine .....                       | 30 |
| 5.4.   | Mesure du peroxyde d'hydrogène urinaire.....                   | 30 |
| 5.5.   | Mesure de l'osmolarité urinaire.....                           | 30 |
| 5.6.   | Mesure de la protéinurie .....                                 | 31 |
| 5.7.   | Concentration en insuline plasmatique.....                     | 31 |
| 5.8.   | Homogénéisation des tissus.....                                | 31 |
| 5.9.   | Concentrations en adipokines plasmatiques et tissulaires ..... | 31 |
| 5.10.  | Western blot .....   | 32 |
| 5.11.  | PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) .....                 | 35 |
| 6.     | Statistiques et calculs .....                                  | 38 |

## RÉSULTATS

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.   | Caractérisation du modèle murin C57Bl/6 d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisse ..... | 39 |
| 1.1. | Paramètres métaboliques .....  | 39 |
|      | <i>Augmentation relative du poids corporel.....</i>  | 39 |
|      | <i>Variation du poids des organes et des données métaboliques .....</i>                                    | 40 |
| 1.2. | Structure et fonction rénale.....  | 42 |
|      | <i>Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'histologie glomérulaire .....</i>                     | 42 |
|      | <i>Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'histologie tubulaire .....</i>                        | 44 |
|      | <i>Évaluation de l'effet du régime et du genre sur les paramètres urinaires.....</i>                       | 45 |
| 2.   | Évaluation de l'effet du régime et du genre sur les adipokines.....  | 46 |
| 2.1. | Leptine .....  | 46 |
| 2.2. | Adiponectine.....  | 47 |
| 2.3. | Chémérine.....   | 49 |
| 3.   | Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'inflammation .....                                       | 51 |
| 4.   | Évaluation de l'effet du régime et du genre sur le stress oxydatif .....                                   | 53 |
| 5.   | Évaluation de l'effet du régime et du genre sur la fibrose .....   | 55 |



## DISCUSSION

|  |    |
|--|----|
| 1. Caractérisation du modèle d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisse et évaluation de l'impact du genre ..... | 58 |
| 1.1. Paramètres métaboliques .....   | 58 |
| 1.2. Structure et fonction rénale .....  | 59 |
| 2. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'expression des adipokines .....   | 61 |
| 2.1. La leptine .....  | 61 |
| 2.2. L'adiponectine .....  | 62 |
| 2.3. La chémérine.....   | 64 |
| 3. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose.....                           | 66 |
| 3.1. L'inflammation .....  | 66 |
| 3.2. Le stress oxydatif .....  | 67 |
| 3.3. La fibrose .....  | 68 |
| 4. Conclusions .....   | 69 |

## BIBLIOGRAPHIE

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 1. Bibliographie..... | 70 |
|-----------------------|----|

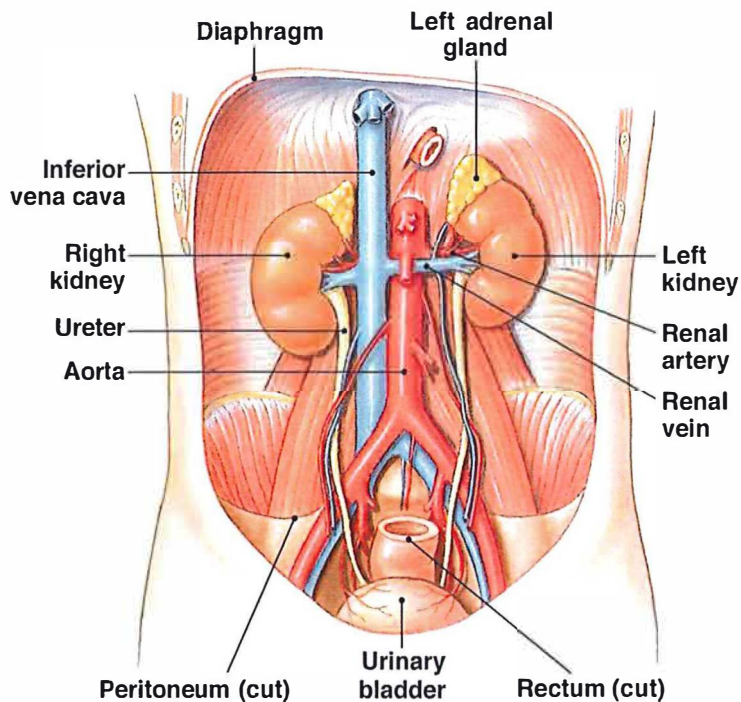
# Introduction

### 1. Généralités sur le rein

Le rein est un organe possédant de nombreuses fonctions physiologiques contribuant à maintenir l'homéostasie de l'organisme. Il représente notamment la principale voie d'élimination des déchets métaboliques, tels que l'ammoniac, l'urée et l'acide urique, ainsi que de substances exogènes, et ce, par filtration du plasma. Il assure, en outre, la régulation de la pression artérielle, de la balance hydro-électrolytique des liquides circulants, de l'équilibre acido-basique et de l'osmolarité. Le rein possède également une fonction endocrine par la production d'hormones (vitamine D), de cytokines et de facteurs régulateurs à action paracrine parmi lesquels on peut citer la rénine, l'angiotensine II, le monoxyde d'azote (Boron & Boulpaep 2012).

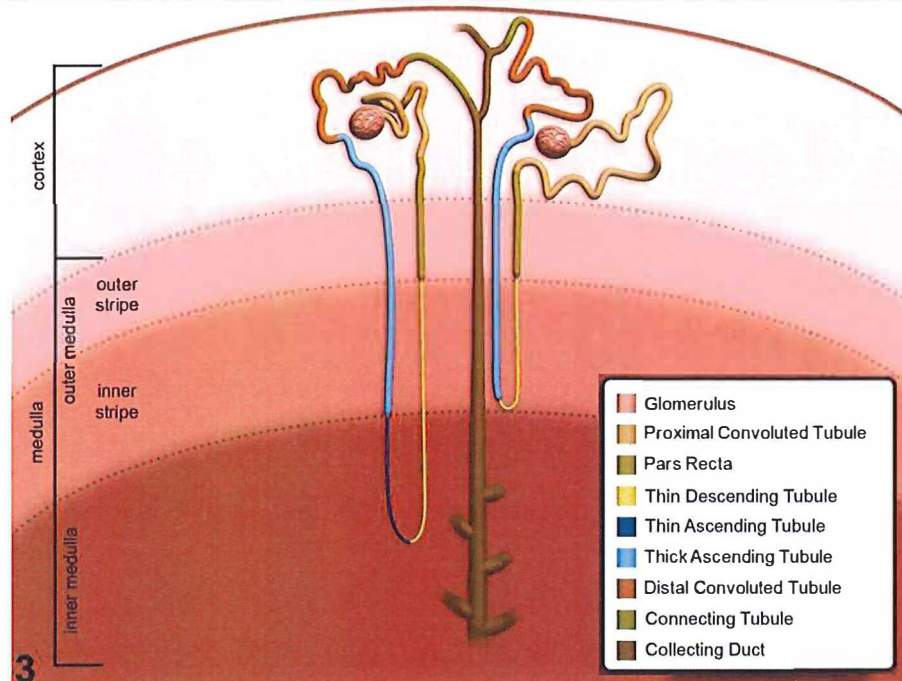
#### 1.1. Anatomie et histologie rénale

Accompagnés des uretères, de la vessie et de l'urètre, les reins font partie intégrante du système urinaire. Chez l'homme, les reins sont au nombre de deux et se trouvent dans la région rétro-péritonéale, surmontés par la glande surrénale (Figure 1).



**Figure 1.** Localisation des reins chez l'homme dans la région rétro-péritonéale, entre la paroi dorsale et le péritoine pariétal (Silverthorn et al. 2007).

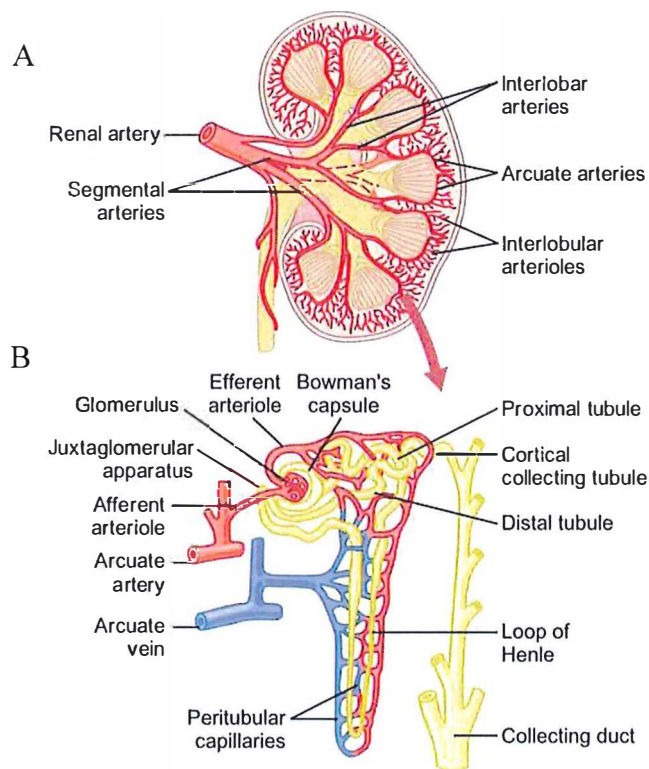
Le parenchyme rénal est subdivisé en quatre couches. La première, la plus externe, est le cortex. La suivante, la médullaire externe, est quant à elle subdivisée en deux couches concentriques : la partie externe de la médullaire externe ou OSOM (Outer Stripe of the Outer Medulla) et la partie interne de la médullaire externe ou ISOM (Inner Stripe of the Outer Medulla). La dernière couche, la plus interne, est la médullaire interne (Figure 2) (Boron & Boulpaep 2012).



**Figure 2.** Organisation des différentes zones du rein : le cortex est la zone la plus externe. Ensuite, plus profondément se trouve la médulla externe, elle-même subdivisée en OSOM et ISOM. Enfin, la couche la plus interne est la médulla interne (Seely & Brix 2005).

Le rein est vascularisé par l'intermédiaire de l'artère rénale, l'une des ramifications de l'aorte abdominale. Au sein du parenchyme rénal, cette artère se subdivise en artères de calibre de plus en plus petit jusqu'à la formation des artères arquées. Au niveau du cortex, ces dernières se ramifient en artérioles afférentes (Figure 3A) qui vont, par la suite, se subdiviser afin de former un peloton capillaire, qui fait partie intégrante du glomérule rénal (Figure 3B). Le sang en provenance des capillaires glomérulaires est ensuite drainé par l'artériole efférente, avant d'atteindre les capillaires péri-tubulaires, puis les veinules et petites veines. Le sang rejoint enfin la veine rénale se jetant dans la veine cave. La perfusion rénale représente 20 à 25% du débit cardiaque. Cette vascularisation importante est indispensable afin d'assurer efficacement toutes ses fonctions (Boron & Boulpaep 2012).



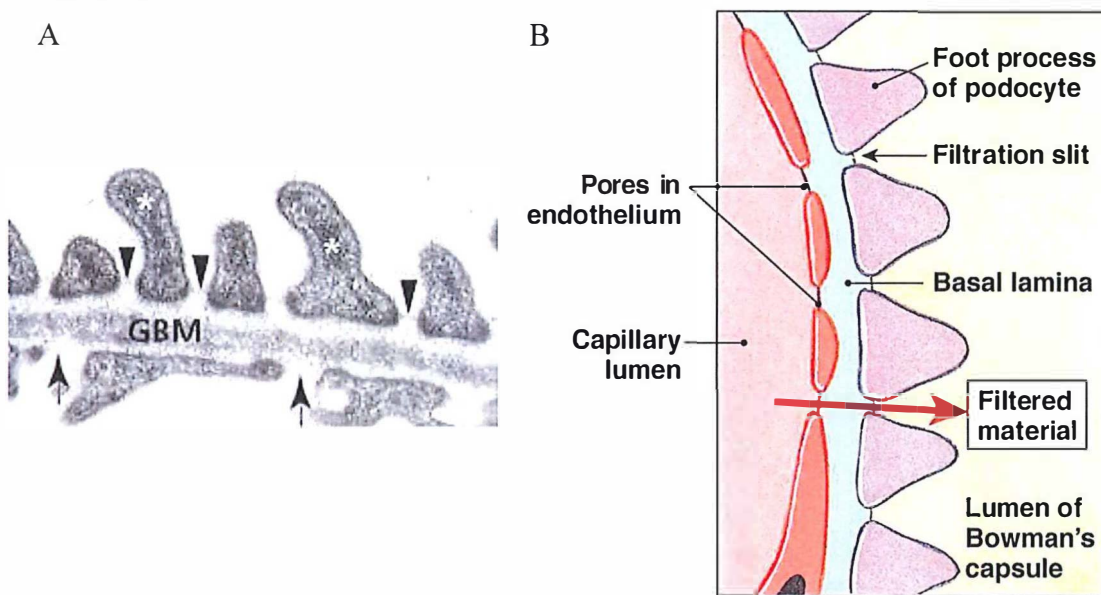


**Figure 3.** Vascularisation A) du rein et B) d'un néphron (Guyton & Hall 2006).

Le néphron, qui est considéré comme l'unité fonctionnelle du système rénal, est une association morpho-fonctionnelle du réseau vasculaire et du système tubulaire rénal. Ces unités parcourent aussi bien le cortex que la médulla, mais sont majoritairement localisées dans le cortex rénal. Chez un homme adulte sain, il existe environ un million de néphrons qui filtrent en moyenne 180 litres de plasma par jour afin de former l'urine primitive ou ultrafiltrat. Cette quantité de plasma filtré par unité de temps correspond au débit de filtration glomérulaire (DFG). Néanmoins, une quantité majeure de l'urine primaire est réabsorbée, et ce, principalement au niveau des tubules proximaux. À la sortie des tubules rénaux, seul 1,5 litre d'urine définitive est produite par jour (Boron & Boulpaep 2012).

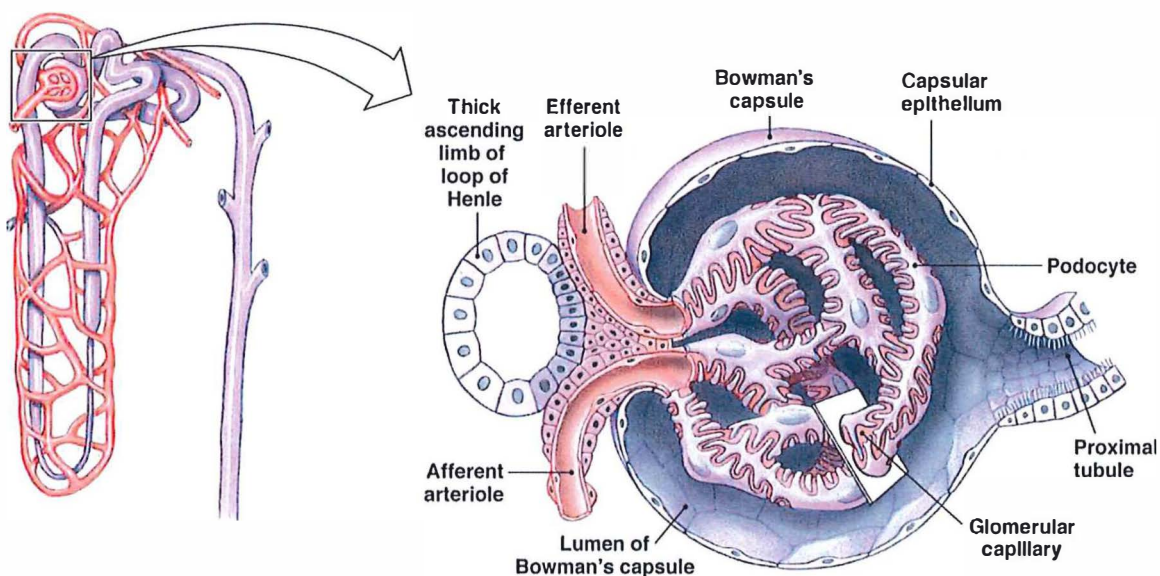
La formation de l'urine débute au niveau du glomérule. Le glomérule, représentant le premier élément du néphron, est constitué d'un peloton capillaire provenant de l'artériole afférente et se retrouve uniquement dans le cortex rénal. Il permet une filtration passive du sang, aussi appelée ultrafiltration, au niveau des capillaires glomérulaires grâce à la pression hydrostatique intracapillaire. Néanmoins, cette filtration reste sélective et ce, grâce à la barrière de filtration glomérulaire composée de l'endothélium fenestré des capillaires, d'une membrane basale et de fentes de filtration formées par les prolongements cytoplasmiques des podocytes, comme illustré Figure 4. L'endothélium fenestré des capillaires possède de larges pores permettant à la majorité des composants du plasma, à l'exception des éléments figurés du sang, de la traverser. Ensuite, la membrane basale entrave le passage de nombreuses protéines plasmatiques, et ce via les protéines chargées négativement qui la composent. Enfin, les prolongements cytoplasmiques des podocytes, dénommés pédicelles, forment des fentes étroites ne laissant passer que le filtrat (Silverthorn et al. 2007).





**Figure 4.** A) Photo de la barrière de filtration glomérulaire en microscopie électronique et B) schéma représentant la structure de la barrière de filtration glomérulaire composée de l'endothélium fenestré, de la lame basale et des prolongements cytoplasmiques des podocytes (Silverthorn et al. 2007). Les astérisques (\*) montrent les pieds podocytaires, les flèches (→) mettent en évidence les pores dans l'endothélium et les triangles (▲) désignent les fentes de filtration. GMB = membrane basale.

L'urine primitive, filtrée à travers la barrière de filtration glomérulaire, est ensuite collectée dans la capsule de Bowman débouchant sur le tubule contourné proximal. La capsule de Bowman est une structure formée de deux feuillets entourant le glomérule : le feuillet pariétal, ayant un rôle structural, et le feuillet viscéral composés des podocytes nécessaires à la barrière de filtration glomérulaire (Figure 5) (Silverthorn et al. 2007).



**Figure 5.** Représentation d'un corpuscule rénal (Silverthorn et al. 2007).

Lors de son trajet dans le système tubulaire, l'ultrafiltrat est soumis à des phénomènes de réabsorption, mais aussi de sécrétion sélectifs de solutés. C'est le cas, par exemple, du glucose, qui est, en condition physiologique, totalement réabsorbé, ou du potassium qui peut à la fois être réabsorbé ou sécrété dans différentes parties tubulaires. Il faut souligner que chacun des segments du système tubulaire possède non seulement une structure, mais aussi une fonction différente, quant à la sécrétion et/ou la réabsorption de certaines substances. Le parcours emprunté par l'urine primitive commence par le tubule contourné proximal, à la sortie de la capsule de Bowman. Elle transite ensuite par la branche descendante de l'anse de Henlé, avant de traverser la branche ascendante de l'anse de Henlé et ainsi atteindre le tubule distal se trouvant dans le cortex rénal. Enfin, à la sortie du système tubulaire, l'urine finale est déversée dans le tube collecteur de Bellini qui finit par rejoindre le bassin, permettant à l'urine d'être excrétée, comme illustré Figure 6 (Boron & Boulpaep 2012).

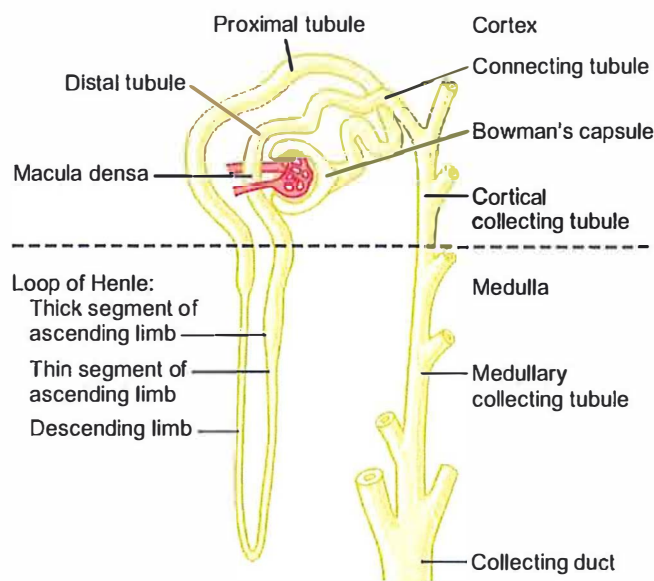


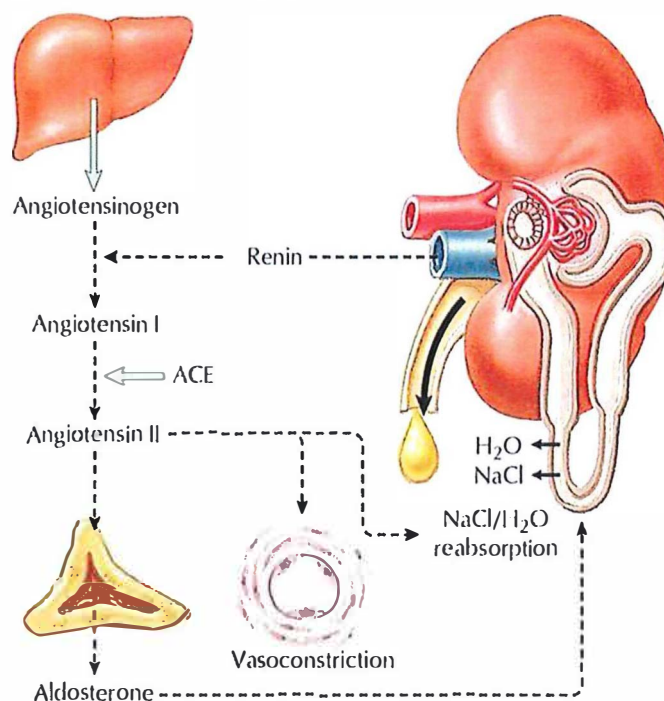
Figure 6. Système tubulaire emprunté par l'urine primitive (Guyton & Hall 2006).

### 1.2.Régulation de la fonction rénale

Plusieurs mécanismes sont nécessaires à la régulation de la fonction rénale afin de produire une urine finale répondant aux besoins corporels. En effet, il faut que l'élimination et la réabsorption de substances telles que les électrolytes et les déchets métaboliques s'opèrent de façon à garantir le maintien de l'homéostasie. En ce qui concerne la régulation du DFG, trois grands mécanismes sont mis en place : l'autorégulation rénale, le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et le système nerveux sympathique (Guyton & Hall, 2006; Boron & Boulpaep, 2012).

L'autorégulation rénale permet de maintenir un DFG constant via la régulation de la pression intra-glomérulaire. Lors de variations de la pression artérielle systémique, les artérioles afférentes voient leur calibre modifié par réflexe vasculaire myogénique. En effet, lorsque la pression artérielle systémique augmente, les parois des artérioles afférentes sont étirées. En réponse à cet étirement, le muscle lisse vasculaire les entourant se contracte menant à une diminution du DFG. Au contraire, lorsque la pression artérielle systémique diminue, il y a un relâchement des parois des artérioles afférentes, induisant la relaxation du muscle lisse vasculaire et donc une augmentation du DFG (Guyton & Hall 2006).

Un autre moyen de réguler le DFG se réalise via le SRAA. Ce système hormonal permet le maintien de l'équilibre hydrosodé et possède un rôle important dans la régulation de plusieurs processus physiologiques. L'angiotensinogène produit par le foie est un précurseur inactif de l'angiotensine II. Ce peptide est clivé par la rénine afin de former l'angiotensine I, elle aussi inactive. La rénine est une enzyme d'origine rénale produite par les cellules granulaires du système juxtaglomérulaire, en réponse à une diminution de la pression artérielle systémique, à une stimulation adrénergique et/ou à l'activation des cellules de la macula densa. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) permet ensuite de cliver l'angiotensine I en angiotensine II, qui possède des effets biologiques importants. En effet, l'angiotensine II stimule, par exemple, la vasoconstriction des artérioles ainsi que la réabsorption tubulaire du chlorure de sodium, augmentant ainsi la pression artérielle. De plus, l'angiotensine II induit la stimulation de la sécrétion de l'aldostérone par les glandes surrénales, augmentant d'autant plus la rétention du sodium et donc la pression artérielle (Figure 7) (Guyton & Hall 2006).



**Figure 7.** Illustration du système rénine-angiotensine-aldostérone (<http://slideplayer.fr/slide/496795/>).

Enfin, le système nerveux sympathique est également capable de réguler le DFG lorsqu'un changement de la pression artérielle systémique est observé. En effet, l'activation du système nerveux sympathique entraîne la libération de noradrénaline menant à une vasoconstriction des artérioles afférentes et donc une diminution du DFG (Guyton & Hall 2006).

## 2. L'insuffisance rénale

À la lumière du rôle indispensable du rein dans le maintien de l'homéostasie, il est aisé de comprendre que tout dysfonctionnement de cet organe peut exercer un impact significatif sur l'état de santé des patients présentant des troubles rénaux. Les atteintes rénales peuvent générer une insuffisance rénale (IR) qui est décrite comme une dégradation progressive ou ponctuelle des fonctions rénales, ainsi que comme une diminution du nombre de néphrons fonctionnels. Les reins ne sont donc plus à même d'assurer leurs fonctions de façon appropriée telles que le maintien de l'équilibre acido-basique et hydro-électrolytique mais aussi l'élimination des



déchets métaboliques, des toxines et de l'eau, menant à leur accumulation dans le plasma (Boron & Boulpaep 2012; Lewis 2012).

Les causes menant à une insuffisance rénale peuvent être variées. Une partie d'entre elles sont liées à l'obésité, l'hypertension artérielle et le diabète qui endommagent les vaisseaux glomérulaires, perturbant leur fonction. Les infections chroniques des voies urinaires, un traumatisme mécanique, une consommation inappropriée de médicaments, une obstruction des voies urinaires, une athérosclérose et une glomérulonéphrite peuvent également être responsable de l'apparition d'une IR (Boron & Boulpaep 2012; Lewis 2012).

Il existe deux types d'insuffisance rénale : l'insuffisance rénale aiguë et l'insuffisance rénale chronique. L'insuffisance rénale aiguë est caractérisée par un arrêt brutal total ou partiel de la fonction rénale. Cependant, dans ce cas, la dégradation de la fonction rénale étant réversible, une récupération est possible, mais nécessite des soins urgents tels qu'une dialyse. L'insuffisance rénale chronique quant à elle, est caractérisée par une perte lente et progressive de néphrons fonctionnels. Cette perte est irréversible et progresse souvent, sur le long terme, vers une détérioration définitive de la fonction rénale, débouchant éventuellement sur une maladie rénale de phase terminale. Ce type d'IR est aussi associé à un risque accru de développement de maladies cardiovasculaires et de mortalité (Guyton & Hall 2006).

L'IR se manifeste par une diminution du DFG, mais aussi par une polyurie, une créatininémie élevée et une perturbation de l'osmolarité urinaire. Néanmoins, ces symptômes ne font leur apparition que lorsque le rein a perdu environ 75% de ses fonctions d'origine, rendant le diagnostic des patients fort tardif. Selon l'occurrence des dommages rénaux et la valeur du DFG, l'IR est classée selon cinq niveaux, le dernier étant l'IR de stade terminal qui requiert la mise en place d'une dialyse ou d'une transplantation. Cette pathologie représente ainsi une cause importante de morbidité et de mortalité de par le monde. L'IR est donc devenue un problème de santé publique majeur au vu de l'augmentation constante des personnes souffrant de cette pathologie (Ruan & Guan, 2009; Lewis, 2012).

### 3. L'obésité

#### 3.1. Généralités

Au cours des trente dernières années, l'incidence mondiale de l'obésité a augmenté de façon spectaculaire (Flegal et al. 2014). En 2013, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids. Parmi ces sujets, 600 millions ont été diagnostiqués en état d'obésité, représentant 13% de la population adulte (O'Neill et al. 2016). D'ici 2030, ce chiffre devrait même atteindre 3,3 milliards d'adultes (Kelly et al. 2008). Face à cette constatation alarmante, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a conclu que l'obésité, affectant autant les hommes que les femmes et toutes les catégories d'âge, était devenue une maladie épidémique, et ce principalement dans les pays industrialisés. L'obésité, ayant pour conséquence une augmentation de la mortalité mais aussi de la morbidité cardiovasculaire, est donc devenue un important problème de santé publique, au vu du gouffre économique qu'il représente (Kelly et al. 2008; Kanasaki & Koya 2011).

L'OMS a établi certaines normes comme indicateur de corpulence afin d'évaluer le risque de développer des maladies liées à l'obésité. Une personne est déclarée obèse lorsque son indice de masse corporelle (IMC) est supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup> et en surpoids lorsque son IMC est compris entre 25 kg/m<sup>2</sup> et 30 kg/m<sup>2</sup>. Cette valeur est calculée en divisant le poids par la taille au carré. Cette méthode de calcul possède cependant quelques limitations ; elle ne peut être utilisée

en l'état pour les femmes enceintes ou qui allaitent, les seniors, les athlètes d'endurance ou les personnes très musclées (World Health Organization 2016).

L'obésité est une maladie métabolique multifactorielle caractérisée par une accumulation excessive et anormale de lipides au sein et autour des organes clés tels que le cœur, les muscles, les reins et le foie. Cette accumulation de graisse a pour conséquence une altération morpho-fonctionnelle de ces tissus et un état inflammatoire chronique, ces deux processus conduisant à des perturbations métaboliques de l'organisme. L'obésité est également associée à d'autres comorbidités telles que l'hypertension et le diabète de type II (Kelly et al. 2008; Nakayama & Wang 2010; Van De Voorde et al. 2013; O'Neill et al. 2016).

Une piste pouvant expliquer l'augmentation de la prévalence de l'obésité est le bagage génétique, qui joue un rôle dans la régulation du poids corporel et la réponse à la prise de nourriture, aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Hariri & Thibault 2010). Néanmoins, l'augmentation spectaculaire de la prévalence de l'obésité à travers le monde, et ce, sur une courte période, ne peut pas être expliquée uniquement par la composante génétique. Un apport excessif en graisses alimentaires semble être la cause de l'épidémie observée par l'OMS. En effet, des études réalisées chez l'homme ont montré que les régimes riches en matières grasses (plus de 30% de l'apport énergétique provient des lipides) peuvent facilement induire l'obésité. L'obésité se développe donc lorsque l'apport calorique dépasse la dépense énergétique. Dans ce cas, l'excès de calories est stocké sous forme de graisse corporelle dans le tissu adipeux afin de constituer des réserves énergétiques (Hill et al. 2000; Hariri & Thibault 2010). Les pays industrialisés, tel que le nôtre, adoptant un mode de vie sédentaire accompagné d'une suralimentation industrialisée et de mauvaise qualité, favorisent donc le développement de l'obésité (Guyton & Hall 2006; Rosini et al. 2012; Nashar & Egan 2014).

Il existe deux types de tissus adipeux (TA) ; le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. Néanmoins, dans le cadre de ce travail, nous allons principalement nous intéresser au tissu adipeux blanc, car c'est le premier organe impacté par l'obésité. Ce tissu est composé de plusieurs types cellulaires tels que les adipocytes, les pré-adipocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les leucocytes. Ces cellules sont également entourées par des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), essentielles à la fonction cellulaire (Boron & Boulpaep 2012).

Il a longtemps été considéré que le tissu adipeux blanc n'était qu'un organe de stockage capable de répondre à un excès d'apport calorique. Cependant, il a été démontré qu'en plus d'être un endroit de stockage, le tissu adipeux blanc présente un rôle endocrinien très important, agissant sur de nombreux processus physiologiques par la sécrétion de diverses molécules. Sur base de cette découverte, une nouvelle classe de molécules a émergé, appelées adipocytokines, ou plus simplement adipokines, incluant la leptine et l'adiponectine. D'autres cytokines sont également sécrétées par le tissu adipeux comme l'interleukine-6 (IL-6), le Facteur de Nécrose Tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et le Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (Wozniak et al. 2009; Van De Voorde et al. 2013). Ces adipokines peuvent aussi bien agir de manière locale ou systémique et jouent des rôles très différents allant de la régulation du métabolisme des lipides et du glucose à l'inflammation, en passant par le contrôle de la coagulation, des comportements alimentaires et de la pression sanguine (Adamczak & Wiecek 2013).

### 3.2. Le syndrome métabolique

L'obésité est également considérée comme un facteur clé dans le développement du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique (MetS) est un terme utilisé pour désigner un syndrome clinique, associé à une combinaison de facteurs de risques cardio-métaboliques qui



augmentent le risque de développer le diabète de type II ou des maladies cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose et l'infarctus du myocarde. Néanmoins, le MetS est une maladie endocrine multifactorielle très complexe et non un cluster de caractéristiques coïncidentes. En effet, ses composants, décrits plus loin, partagent plusieurs mécanismes communs sous-jacents qui incluent l'accumulation ectopique de graisse, une altération de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de l'inflammation systémique (Bruce & Byrne 2009; Kaur 2014).

En 2005, ce syndrome affectait déjà environ 25 % de la population aux États-Unis (Kaur 2014). Le MetS présente une étiologie très complexe incluant des facteurs héréditaires, l'environnement intra-utérin, la sédentarité, le vieillissement, des tendances anormales d'accumulation de graisse et une alimentation riche en lipides. De plus, le risque de développer ce syndrome s'accroît en corrélation avec l'augmentation de l'IMC et de l'âge (Praga et al. 2000; Kaur 2014).

Il existe plusieurs définitions du MetS qui varient d'une source à l'autre (Figure 8). Cependant, il existe quatre critères caractéristiques communs acceptés de tous : la résistance à l'insuline, l'hypertension, la dyslipidémie athérogénique et l'obésité (Figure 9). Le MetS peut donc être défini comme une combinaison de trois ou plus de ces facteurs de risque. Ce syndrome peut également être accompagné d'une intolérance au glucose, une hyperglycémie (glycémie à jeun supérieure à 120 mg/dL), une stéatose hépatique non-alcoolique, un syndrome de l'ovaire poly-kystique, une hyperinsulinémie, un niveau plasmatique élevé en Very Low-Density Lipoprotein (VLDL) et faible en High-Density Lipoprotein (HDL), une athérosclérose, un état pro-inflammatoire (inflammation systémique de bas grade), une thrombose, un stress oxydatif et enfin une microalbuminurie (Bruce & Byrne 2009; Kaur 2014; O'Neill et al. 2016).

## Introduction

| Clinical measures  | WHO (1998) [5]   | EGIR (1999) [6]   | ATPIII (2001) [7]  | AACE (2003) [8]   | IDF (2005) [9]  |
|--------------------|--|---|--|---|---|
| Insulin resistance | IGT, IFG, T2DM, or lowered insulin Sensitivity <sup>a</sup> plus any 2 of the following          | Plasma insulin >75th percentile plus any 2 of the following | None, but any 3 of the following 5 features                | IGT or IFG plus any of the following based on the clinical judgment | None  |
| Body weight        | Men: waist-to-hip ratio >0.90; women: waist-to-hip ratio >0.85 and/or BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> | WC ≥94 cm in men or ≥80 cm in women                         | WC ≥102 cm in men or ≥88 cm in women                       | BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup>  | Increased WC (population specific) plus any 2 of the following                          |
| Lipids             | TG ≥150 mg/dL and/or HDL-C <35 mg/dL in men or <39 mg/dL in women                                | TG ≥150 mg/dL and/or HDL-C <39 mg/dL in men or women        | TG ≥150 mg/dL HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women | TG ≥150 mg/dL and HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women      | TG ≥150 mg/dL or on TGs Rx, HDL-C <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or on HDL-C Rx |
| Blood pressure     | ≥140/90 mm Hg  | ≥140/90 mm Hg or on hypertension Rx                         | ≥130/85 mm Hg  | ≥130/85 mm Hg   | ≥130 mm Hg systolic or ≥85 mm Hg diastolic or on hypertension Rx                        |
| Glucose            | IGT, IFG, or T2DM  | IGT or IFG (but not diabetes)                               | >110 mg/dL (includes diabetes)                             | IGT or IFG (but not diabetes)                                       | ≥100 mg/dL (includes diabetes) <sup>b</sup>   |
| Other              | Microalbuminuria: Urinary excretion rate of >20 mg/min or albumin: creatinine ratio of >30 mg/g. |   |  | Other features of insulin resistance <sup>c</sup>                   |   |

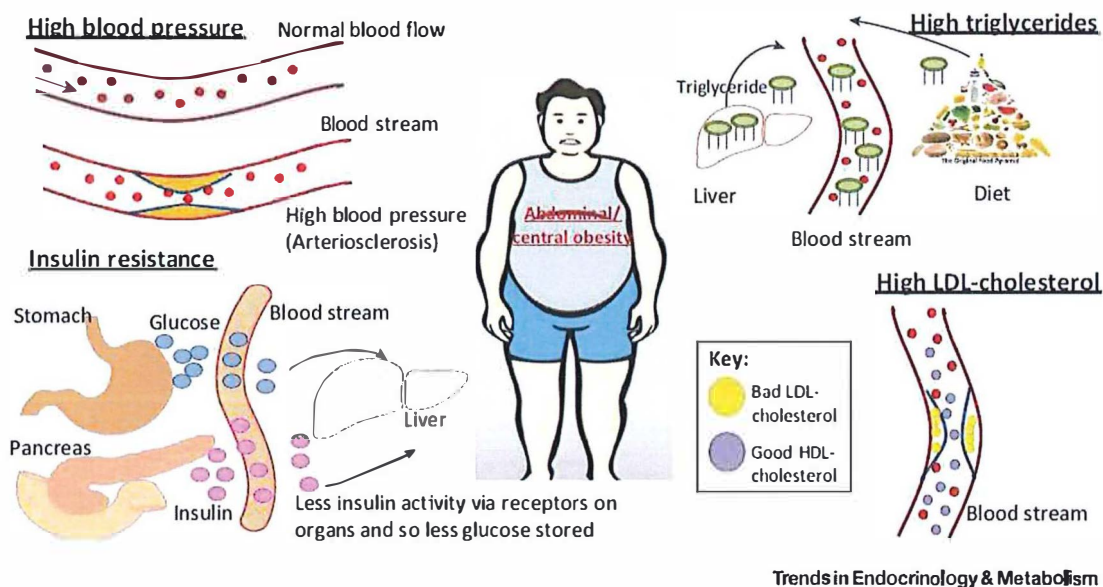
<sup>a</sup>Insulin sensitivity measured under hyperinsulinemic euglycemic conditions, glucose uptake below lowest quartile for background population under investigation.

<sup>b</sup>In 2003, the American Diabetes Association (ADA) changed the criteria for IFG tolerance from >110 mg/dL to >100 mg/dL [10].

<sup>c</sup>Includes family history of type 2 diabetes mellitus, polycystic ovary syndrome, sedentary lifestyle, advancing age, and ethnic groups susceptible to type 2 diabetes mellitus.

BMI: body mass index; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; IFG: impaired fasting glucose; IGT: impaired glucose tolerance; Rx: receiving treatment; TGs: triglycerides; T2DM: type 2 diabetes mellitus; WC: waist circumference.

**Figure 8.** Différentes définitions du syndrome métabolique suivant les critères de diagnostic. WHO : World Health Organization (OMS) ; EGIR : European Group for the study of Insulin Resistance ; ATP III : Adult Treatment Panel III ; AACE : American Association of Clinical Endocrinologists ; IDF : International Diabetes Federation (Kaur 2014).



**Figure 9.** Les quatre grandes caractéristiques du syndrome métabolique incluant la résistance à l'insuline (RI), l'obésité, l'hypertension, l'augmentation de la concentration en triglycérides et en LDL-cholestérol dans le sang. HDL : High-Density Lipoprotein ; LDL : Low-Density Lipoprotein (O'Neill et al. 2016).

### 3.2.1. La résistance à l'insuline (RI)

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Cette hormone est sécrétée en période post-prandiale, en réponse à l'augmentation de la glycémie, afin d'utiliser de façon optimale le glucose fourni par l'alimentation. Elle agit au niveau de différents tissus périphériques tels que le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique. L'insuline permet notamment le stockage du glucose sanguin sous forme de glycogène dans les hépatocytes et le contrôle du métabolisme des lipides par l'augmentation de la lipogénèse et la diminution de la lipolyse (Boron & Boulpaep 2012).

La RI correspond à la diminution de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. Ces tissus ne parviennent plus à utiliser le glucose de manière appropriée, en réponse à la stimulation de l'insuline, induisant ainsi une augmentation des concentrations plasmatiques en glucose (hyperglycémie). Cette hyperglycémie mène à terme à une augmentation de l'insuline plasmatique (hyperinsulinémie). La résistance à l'insuline est un processus graduel et peut donc, à terme, mener au développement d'un diabète de type II (Guyton & Hall 2006; Boron & Boulpaep 2012).

Il est à noter qu'une augmentation de la masse de graisse viscérale, observée lors de l'obésité, peut aussi contribuer au développement de la RI. En effet, ce type de graisse est plus « résistante » aux effets métaboliques de l'insuline (Power & Schulkin 2008). De plus, le développement de l'obésité est associé à une réponse inflammatoire qui pourrait également induire une résistance à l'insuline (Wozniak et al. 2009).

### 3.2.2. Obésité ou adiposité viscérale

Le tissu adipeux est un organe dynamique capable de répondre à un excès d'apport calorique en induisant son stockage, mais est aussi capable de mobiliser les acides gras ainsi stockés, suivant la demande. Néanmoins, sa capacité de stockage est restreinte car sa croissance est limitée.

En cas d'obésité, il se produit une expansion excessive de tissu adipeux (TA) blanc. Lorsque la capacité du TA à stocker les graisses n'est plus suffisante, les acides gras excédentaires sont délivrés dans la circulation sanguine. Ces lipides vont ensuite aller se déposer et être stockés dans des sites ectopiques, tels que le cœur, le foie et les reins, causant une hypertrophie de ces organes. L'accumulation de lipides se fait dans et autour d'organes clés, induisant une détérioration de leurs fonctions. L'accumulation ectopique de graisse est généralement la conséquence de l'adiposopathie. En effet, l'adiposopathie est le mécanisme par lequel un TA sain devient pathogénique. Elle se manifeste par une hypertrophie et hyperplasie des adipocytes, une distribution ectopique de la graisse et une accumulation de TA viscéral. Cette transition pathologique est favorisée par un style de vie sédentaire et un apport excessif de calories, principalement en acides gras, ce qui entraîne des perturbations métaboliques, telles que la résistance à l'insuline, ainsi qu'une inflammation chronique et donc contribue au développement du MetS (Van De Voorde et al. 2013).

L'accumulation ectopique de graisse et l'état pro-inflammatoire causés par l'obésité se situent au cœur de la pathogenèse du MetS. En effet, il existe une forte association entre l'augmentation de la prévalence du MetS et l'augmentation de la prévalence de l'obésité ainsi que l'accumulation de la graisse viscérale. Cependant, le mécanisme d'association de ces composants n'est pas complètement élucidé. Toutefois, il a été proposé que la graisse viscérale puisse être au centre des mécanismes sous-jacents. En effet, la libération d'adipokines pro-inflammatoires, causée par l'expansion de l'adiposité viscérale et l'augmentation de l'infiltration des macrophages, induirait des perturbations métaboliques telles que la résistance



à l'insuline, le diabète de type II, une inflammation systémique et augmenterait les risques de maladies cardio-vasculaires. Par exemple, l'augmentation de la sécrétion du TNF- $\alpha$ , induite par l'obésité, stimulerait la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires dans la circulation, ce qui pourrait contribuer à la résistance à l'insuline (Rabe & Lehrke 2008; Bruce & Byrne 2009; Ruan & Guan 2009).

### 3.2.3. Dyslipidémie athérogénique

La dyslipidémie est une accumulation des acides gras libres, des triglycérides (hypertriglycémie – taux de triglycérides supérieur ou égal à 150 mg/dL), des apolipoprotéines B, des LDL et des VLDL dans le sang. Ce symptôme du MetS est également caractérisé par une diminution du taux de HDL-cholestérol.

Lorsque la concentration sanguine en lipides devient trop importante, une lipotoxicité est observée. Dans ce cas, les lipides deviennent toxiques car ils peuvent entraîner une augmentation de la production de métabolites endommagés et induire des dommages cellulaires et tissulaires. Ce mécanisme pathologique peut ainsi initier une nécrose cellulaire et le développement d'une inflammation systémique. Par exemple, les acides gras circulant peuvent endommager l'endothélium et accélérer la progression naturelle des plaques d'athérome (Felizardo et al. 2014; Kaur 2014).

### 3.2.4. Hypertension

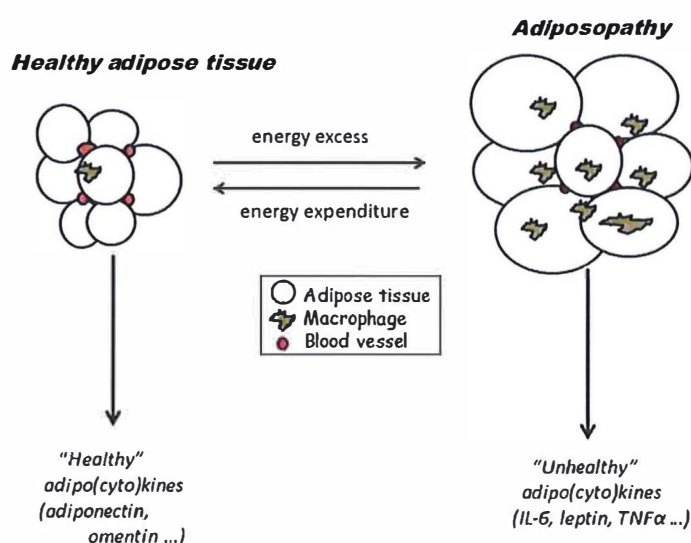
L'hypertension est une pathologie cardiovasculaire multifactorielle causée par un dysfonctionnement de l'endothélium. Ce dysfonctionnement peut résulter d'une augmentation du niveau de sécrétion d'adipokines, comme c'est le cas chez les patients obèses. En effet, la leptine, une hormone dont la sécrétion est augmentée lors de l'obésité, peut augmenter la pression sanguine par l'activation du système nerveux sympathique et une vasodilatation des vaisseaux sanguins (Yiannikouris et al. 2012). Néanmoins, les adipokines ne sont pas les seules responsables de l'hypertension. En effet, les plaques d'athérome, se formant lors d'une dyslipidémie, aussi observée en cas d'hypertension, peuvent augmenter la pression artérielle par rétrécissement de la lumière du vaisseau sanguin. Il est à noter qu'une personne est considérée en hypertension lorsque sa pression artérielle est supérieure à 130 / 85 mmHg (Guyton & Hall 2006; Kaur 2014).

L'hypertension seule est une cause connue d'insuffisance rénale chronique. En effet, elle peut conduire à une glomérulosclérose et à une protéinurie légère indépendamment de l'hyperlipidémie et de l'obésité centrale. De plus, elle est associée à un risque accru de développement d'une microalbuminurie causée par l'augmentation de la pression intraglomérulaire. En effet, cette augmentation induirait une lésion de l'épithélium qui conduirait à une « fuite » de l'albumine (Eknayan 2011).

## 3.3. Inflammation

Le tissu adipeux renferme une quantité substantielle de cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes et les éosinophiles. Les macrophages constituent la principale population de cellules inflammatoires résidentes et recrutées dans le tissu adipeux. Ces cellules participent à la clairance des débris cellulaires ainsi que des cellules mortes. Il existe une différence entre les macrophages de type M2, qui sont anti-inflammatoires, et les macrophages de type M1, qui sont pro-inflammatoires. Les macrophages M1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 alors que les macrophages M2, quant à eux, sécrètent des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et sont surtout importants pour la résolution de l'inflammation et la réparation des tissus. En cas d'obésité, on observe un

accroissement de la mort cellulaire des adipocytes en lien avec l'hypertrophie et l'hypoxie du tissu adipeux. Ceci a pour conséquence un recrutement des monocytes accompagné d'une polarisation des macrophages résidents non inflammatoires de type M2 vers un phénotype M1 (Ricardo et al. 2008; Buechler et al. 2015). Il en résulte donc une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que le  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 et MCP-1, mais aussi une diminution des cytokines anti-inflammatoires, menant à un état d'inflammation chronique. Ces cytokines auraient pour rôle de recruter davantage de macrophages au sein du tissu adipeux et d'induire la libération de cytokines par ces cellules nouvellement mobilisées. Il y a donc une augmentation du nombre de cellules immunitaires pro-inflammatoires infiltrées. En outre, en plus du  $\text{TNF-}\alpha$  et du MCP-1 sécrétés par les macrophages infiltrés, les adipocytes sécrètent de l'IL-6, altérant le processus de lipolyse et le métabolisme du glucose en interférant avec l'action de l'insuline (Nakamura et al. 2011; Felizardo et al. 2014) (Figure 10).



**Figure 10.** L'excès d'apport calorique mène à une adisopathie caractérisée par une hypertrophie et une hypoxie des adipocytes et une infiltration des macrophages de type M1. Ceci a pour effet de favoriser la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires (Van De Voorde et al. 2013).

L'excès de tissu adipeux est la principale source de l'élévation des taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le plasma. En effet, une adiposité excessive entraîne une augmentation de l'activation des enzymes pro-oxydantes et une diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes. Cette augmentation de la production de ROS induit par la suite la synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoires, accentuant l'inflammation au sein du tissu adipeux. Ceci aurait pour effet d'altérer la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas, mais aussi d'induire une RI. De plus, il a été démontré que l'hyperglycémie et la production excessive de  $\text{TNF-}\alpha$ , observées en cas d'obésité, stimulent la production de ROS par les cellules glomérulaires et tubulaires proximales. Cette facette de l'obésité se trouve être un facteur important dans le développement de l'hypertension et l'athérosclérose, mais aussi dans le développement de lésions rénales et donc la progression des pathologies associées (Furukawa et al. 2004; Prasad 2014). En effet, le stress oxydatif provoque l'apoptose des podocytes et des cellules mésangiales, ce qui a pour effet d'accentuer l'apparition d'une protéinurie, d'une expansion mésangiale et d'une glomérulosclérose (Shah et al. 2007).



### 3.4.Effet du genre sur l'obésité

Bien que l'obésité affecte autant les hommes que les femmes, la prévalence de l'obésité est généralement plus élevée chez ces dernières que chez les sujets masculins (Lovejoy & Sainsbury 2009; Asarian & Geary 2013). Plusieurs différences ont ainsi pu être mises en évidence entre les deux sexes. La première concerne la distribution du tissu adipeux ; les femmes ont tendance à stocker la graisse au sein du tissu adipeux sous-cutané alors que les hommes forment de façon privilégiée des dépôts graisseux au niveau des viscères. De plus, les femmes possèdent souvent plus de masse grasseuse et résistent davantage à la consommation des réserves énergétiques que les hommes. Néanmoins, jusqu'à la ménopause, elles souffrent moins souvent de complications métaboliques liées à l'obésité telles que les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II. Cette constatation pourrait être expliquée par la localisation différentielle de la graisse. Ainsi, il a été proposé que les adipocytes sous-cutanés serviraient au stockage à long terme de la graisse alors que les adipocytes viscéraux seraient beaucoup plus facilement mobilisables. La ménopause influençant grandement ce phénomène, les hormones sexuelles possèderaient donc un rôle important dans la régulation de la distribution de la masse grasseuse (Shi & Clegg 2009; Brown & Clegg 2010; Meyer et al. 2012; Pradhan 2014; White & Tchoukalova 2014).

Néanmoins, ces différences ne s'arrêtent pas à la localisation de la masse grasseuse. Les hormones sexuelles, comprenant les œstrogènes et la progestérone chez les femelles et les androgènes chez les mâles, sont aussi impliquées dans le métabolisme des graisses et du glucose (Mayes & Watson 2004; Power & Schulkin 2008; Meyer et al. 2012). En effet, les sujets féminins semblent accumuler plus de lipides et ont une plus grande sensibilité à l'insuline que les hommes. Néanmoins, les mécanismes qui sont responsables de cette différence de sensibilité à l'insuline ne sont pas encore totalement élucidés, mais des études suggèrent que les œstrogènes seraient impliqués dans la protection des femelles contre la RI. Les hommes, quant à eux, via l'action de la testostérone, ont tendance à augmenter le phénomène de lipolyse. Les œstrogènes jouent également un rôle important, aussi bien chez les femmes que chez les hommes. Par exemple, l'œstradiol possède des effets directs sur le tissu adipeux mais affecte également la prise alimentaire et la consommation de l'énergie (Power & Schulkin 2008; Varlamov et al. 2014).

Il existe également une différence quant à la production d'hormones, telles que l'adiponectine et la leptine. En effet, ces deux hormones présentent des niveaux sériques plus importants chez la femme (Shi & Clegg 2009; White & Tchoukalova 2014; Mauvais-Jarvis 2015). Cependant, les mécanismes impliqués dans cette différence hormonale restent peu connus et nécessitent davantage d'investigations.

### 3.5.Maladies rénales associées à l'obésité

Le rein est l'un des organes les plus affecté par l'obésité. En effet, des études épidémiologiques ont pu mettre en évidence qu'au cours des dernières décennies, l'incidence de l'insuffisance rénale a augmenté en corrélation avec la prévalence de l'obésité (Eknoyan 2011). À partir de cette constatation, il a été démontré qu'un excès de graisse peut être considéré comme un facteur de risque pour le développement d'une maladie rénale chronique. De plus, il y existe une association étroite, complexe et bidirectionnelle, entre le Mets et les maladies rénales chroniques. Cette association est linéaire et devient plus robuste lorsqu'on augmente le nombre de composants du MetS. Cependant, il n'a toujours pas été déterminé si cette association était causale. Les facteurs physiopathologiques qui contribuent aux maladies rénales chez les patients présentant le MetS sont complexes et impliquent la résistance à l'insuline, la

perturbation de la sécrétion des adipokines, le stress oxydatif, l'inflammation, l'hypertension et l'obésité (Eknoyan 2011; Nashar & Egan 2014).

Le dépôt ectopique de graisse au niveau du tissu rénal est capable d'induire des changements anatomiques et histologiques. Chez un sujet obèse, il n'est pas rare d'observer une augmentation de la taille et du poids des reins. Néanmoins, l'unité la plus affectée par l'obésité est le glomérule rénal. En effet, une augmentation de leur taille est généralement constatée, traduisant une expansion de la matrice mésangiale et une glomérulosclérose, accompagnée d'une hypertrophie et d'un détachement progressif des podocytes. Cependant, les tubules ne sont pas en reste. On peut par exemple observer une atrophie tubulaire ainsi qu'une fibrose interstitielle. Ces changements morphologiques ont des répercussions fonctionnelles, comme une hyperfiltration glomérulaire, une protéinurie et une albuminurie résultant d'altérations hémodynamiques (hypertension intraglomérulaire et augmentation du DFG). Ces dommages sont le signes de lésions rénales pouvant mener à terme à une insuffisance rénale chronique (Kambham et al. 2001; Serra et al. 2008; Goumenos et al. 2009; Eknoyan 2011; Kalaitzidis & Siamopoulos 2011; Nashar & Egan 2014).

Les altérations de la fonction rénale décrites précédemment peuvent également avoir pour origine les perturbations métaboliques et hormonales causées par l'obésité. Par exemple, l'hyperleptinémie pourrait promouvoir l'apparition de la glomérulosclérose (Adamczak & Wiecek 2013). De plus, l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, la RI et le stress oxydatif, qui sont communément observés dans l'obésité, feraient partie des mécanismes physiopathologiques sous-jacents au développement des lésions rénales (Eknoyan 2011; Felizardo et al. 2014).

### Mécanismes physiopathologiques de la glomérulopathie induite par l'obésité

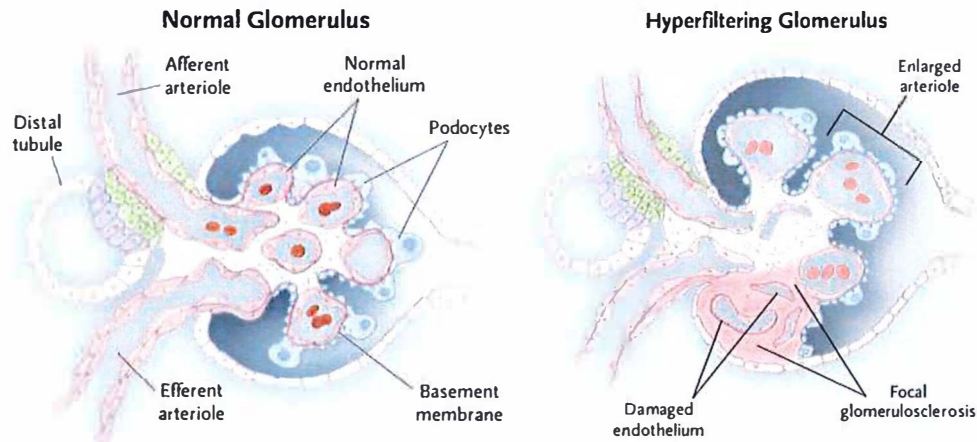
La glomérulopathie induite par l'obésité tirerait son origine de plusieurs perturbations morpho-fonctionnelles dont les plus importantes sont l'hyperfiltration glomérulaire, l'expansion de la matrice mésangiale et l'épaississement de la membrane basale du glomérule, l'effacement podocytaire, l'activation du SRAA et une rétention sodique accrue au niveau tubulaire (Kambham et al. 2001; Christou & Kiortsis 2014; Nashar & Egan 2014).

L'anomalie rénale la plus répandue chez les sujets obèses est l'expansion de la matrice mésangiale (Eknoyan 2011). Elle est le résultat d'une activation des cellules mésangiales suite à différents stimuli liés à l'obésité tels que la production de cytokines pro-inflammatoires dont le TGF- $\beta$  et le MCP-1. En réponse à ces stimulations, ces cellules produisent de la matrice extracellulaire de façon inappropriée (Lee 2011; Declèves et al. 2014).

Comme suggère l'étude de Chagnac et al. (2000), l'obésité conduit également à une augmentation du DFG ainsi qu'à une réduction du nombre de néphrons. Ces deux phénomènes ont pour conséquence l'induction d'une hyperfiltration glomérulaire, causée par une élévation du débit sanguin rénal. Celle-ci peut découler d'une modification de calibre des artérioles glomérulaires à la suite d'une activité sympathique accrue, d'une hyperinsulinémie et de l'action de l'angiotensine II (Guyton & Hall 2006; Silverthorn et al. 2007). De plus, afin de compenser la perte des glomérules fonctionnels, de répondre aux besoins métaboliques et de maintenir un taux de filtration global constant, le système rénal met en place une hyperfiltration via l'augmentation de la pression intraglomérulaire, comme illustré Figure 11 (Ingelfinger 2003). Cette hyperfiltration est également accompagnée d'une hypertrophie des glomérules restants, pouvant atteindre une augmentation de 50% de la surface glomérulaire chez un individu obèse. Ce mécanisme adaptatif entraîne, sur le long terme, des altérations glomérulaires, comme une expansion de la matrice mésangiale, une dilatation des capillaires et



un effacement podocytaire (Ingelfinger 2003; Silverthorn et al. 2007; Goumenos et al. 2009; Laville 2011; Dissard et al. 2013).



**Figure 11.** Comparaison entre un glomérule normal et un glomérule hyperfiltrant (Ingelfinger 2003).

Une conséquence importante de l'obésité au niveau rénal est la sur-activation du SRAA, qui découle de la surexpression de l'angiotensinogène par les hépatocytes, dont la synthèse est stimulée par l'insuline. Les patients souffrant d'hyperinsulinémie induite par l'obésité présentent une hyper-activation du SRAA qui participe, via le renforcement de l'hypertension, à l'hyperfiltration glomérulaire, ainsi qu'au développement de lésions rénales. On observe, en outre, au niveau tubulaire, une augmentation de la réabsorption du sodium à partir de l'urine primitive, favorisant également l'hyperfiltration glomérulaire. Cependant, le système SRAA n'est pas le seul en cause (Silverthorn et al. 2007; Kalaitzidis & Siamopoulos 2011). En effet, l'hyperglycémie est également impliquée dans l'augmentation de la rétention du sodium. Le sodium, suivant la pression oncotique engendrée par la réabsorption du glucose, est réabsorbé de façon proportionnelle à la quantité de glucose présent dans l'urine primaire, au niveau du tubule proximal. Lors d'une hyperglycémie, la réabsorption du glucose étant nettement augmentée, celle du sodium l'est également (Guyton & Hall 2006).

Un biomarqueur de cette altération de la fonction rénale, à savoir une glomérulopathie, est la microalbuminurie. Elle est définie comme l'excrétion faible mais anormale d'albumine dans les urines. La microalbuminurie elle est causée par une augmentation de la perméabilité vasculaire et par l'altération de la barrière de filtration glomérulaire et plus précisément par un effacement des podocytes, en lien avec la diminution en adiponectine plasmatique que l'on peut observer en cas d'obésité. La microalbuminurie est également considérée comme un marqueur de risque accru aux maladies cardiovasculaires, mais aussi un marqueur précoce de l'altération de la fonction rénale, dont le développement d'une protéinurie (Eknayan 2011; Laville 2011; Christou & Kiortsis 2014; Sweiss & Sharma 2014).

### 3.6. Adipo(cyto)kines

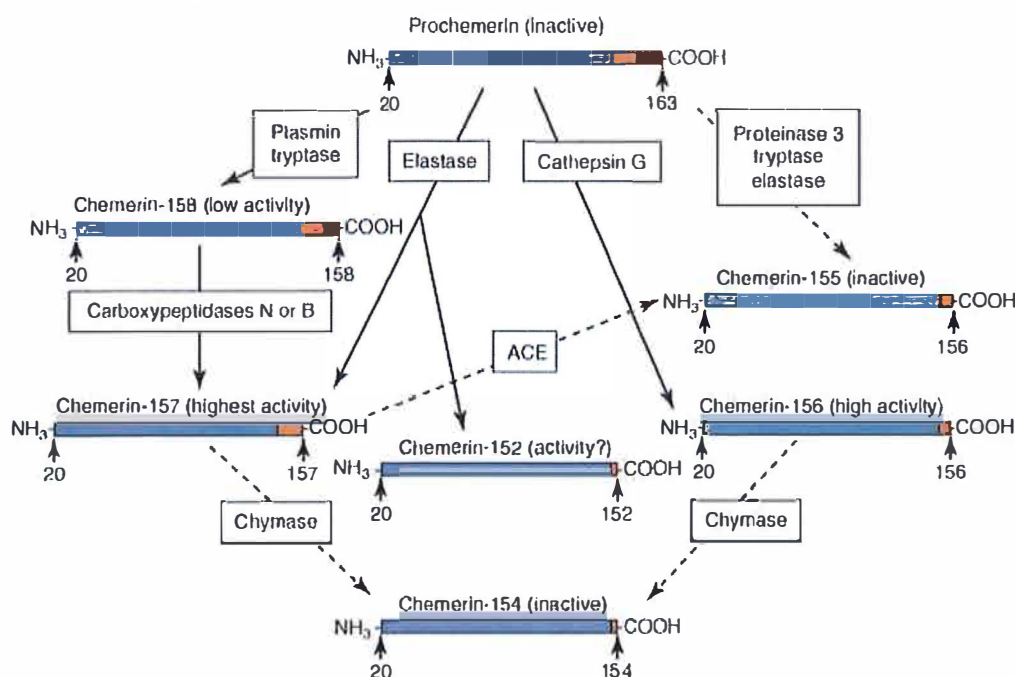
Les adipocytes, ayant un rôle endocrine, sécrètent des adipokines dans le sang, et ce, de manière proportionnelle à la quantité de tissu adipeux. Par conséquent, les sujets obèses présentent une sécrétion anormale de ces adipokines dans le sang, induite par une altération progressive des fonctions du tissu adipeux. Par exemple, on observe une sécrétion excessive des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), l'IL-6, le MCP-1, le plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), la résistine, les glucocorticoïdes, mais aussi de la chémérine et la leptine. À l'opposé, la sécrétion de l'adiponectine est diminuée. Cette modification du profil de sécrétion des adipokines contribue, entre autres, au développement

d'une inflammation systémique de bas grade. Il a donc été proposé que la sécrétion anormale d'adipokines en cas d'obésité, engendrée par l'hypoxie ou un trauma mécanique lié à l'hyperplasie ou l'hypertrophie du tissu adipeux, pourrait être un facteur clé dans la progression des maladies associées à l'obésité (Rabe & Lehrke 2008; Nakayama & Wang 2010; Nakamura et al. 2011; Adamczak & Wiecek 2013).

## 3.6.1. Chémérine

Découverte en 1997, la chémérine, également connue sous le nom de « retinoic acid receptor responder protein 2 » (RARRES2) ou « tazarotene-induced gene protein 2 » (TIG2), est une adipokine de 18 kDa. Cette adipokine est sécrétée par divers types cellulaires, y compris les adipocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les hépatocytes, les kératinocytes et les cellules tubulaires rénales (Rabe & Lehrke 2008; Ernst & Sinal 2010; Bonomini & Pandolfi 2015; Rourke et al. 2015).

Une caractéristique importante de cette adipokine, qui rend son étude complexe, est que la chémérine est exprimée sous diverses isoformes présentant différents niveaux de bioactivité. Effectivement, cette chémokine est d'abord synthétisée sous forme d'une pro-chémérine, composée de 163 acides aminés et peu active biologiquement. Elle est ensuite clivée au niveau de sites distincts dans la partie C-terminale du peptide par différentes protéases du microenvironnement, menant à la production de plusieurs isoformes. Dans certains cas, plusieurs clivages sont nécessaires pour activer totalement la chémérine. Les protéases nécessaires à la maturation de la chémérine sont des « neutrophil serine proteases », des protéases de la cascade de coagulation et de la fibrinolyse incluant la plasmine, la cathepsine G, l'élastase, la tryptase et le facteur XII. La longueur du segment C-terminal de la chémérine est donc variable d'une isoforme à l'autre, suivant le site de clivage et la protéase impliquée. La chémérine est enfin inactivée par « l'angiotensin converting enzyme », la protéinase 3, la tryptase, l'élastase et la « mast cells chymase » (Figure 12). La chémérine subit donc de nombreuses régulations, via un clivage protéolytique, modulant ainsi les concentrations en chémérine bioactive (Ernst & Sinal 2010; Bondue et al. 2011; Mattern et al. 2014).



**Figure 12.** Maturation de la chémérine vers une forme active ou inactive par diverses enzymes (Ernst & Sinal 2010).



À ce jour, la chémérine possède trois récepteurs connus : chemokine-like receptor-1 (CMKLR1), G protein-coupled receptor-1 (GPR1) et chemokine (CC motif) receptor-like 2 (CCRL2), qui sont tous des récepteurs couplés aux protéines G (Ernst & Sinal 2010; Bondue et al. 2011; Rourke et al. 2015). Les cellules exprimant ces récepteurs sont majoritairement les cellules du système immunitaire, comme les macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les cellules dendritiques et les lymphocytes. Cependant, les adipocytes expriment également CMKLR1 (Yoshimura & Oppenheim 2011; Ernst et al. 2012; Monnier et al. 2012; Roman et al. 2012; Catalan et al. 2013; Mattern et al. 2014).

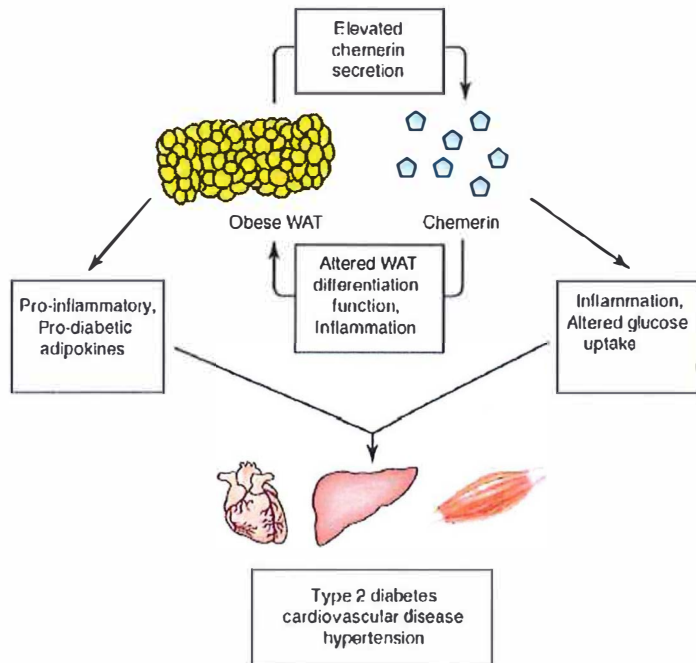
Grâce à son interaction avec ces nombreux récepteurs, la chémérine peut jouer plusieurs rôles. Elle a d'abord été caractérisée en tant que protéine chemoattractante, jouant un rôle dans l'immunité (Bozaoglu et al. 2007; Goralski et al. 2007). En se liant à son récepteur CMKLR1, la chémérine est capable de recruter plusieurs cellules du système immunitaire telles que les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques, vers le site inflammatoire (Fulop et al. 2014). Néanmoins, elle intervient également dans divers processus physiologiques tels que la différenciation et la maturation des adipocytes, la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose et l'homéostasie des lipides par la stimulation de la lipolyse dans les adipocytes. Il est probable que l'étendue des fonctions de la chémérine soit associée aux différentes isoformes de la chémérine (Goralski et al. 2007; Roh et al. 2007; Rabe & Lehrke 2008; Ernst & Sinal 2010; Fatima et al. 2014).

### 3.6.1.1. Chémérine et obésité

Compte tenu de ses différentes fonctions, qui suggèrent un rôle pro-inflammatoire et métabolique, l'implication de la chémérine dans l'obésité a été envisagée. Il a donc été émis comme hypothèse que la chémérine pourrait contribuer à une inflammation du tissu adipeux ainsi qu'au MetS (Chu et al. 2012; Fulop et al. 2014; Li et al. 2014). Plusieurs études ont ainsi montré que la sécrétion de chémérine est augmentée chez les sujets obèses, et ce de façon proportionnelle à la quantité de graisse corporelle, mais aussi à l'augmentation plasmatique de cytokines pro-inflammatoires (Roh et al. 2007; Chu et al. 2012; Li et al. 2014). La chémérine, induisant l'adipogenèse, pourrait provoquer l'expansion du tissu adipeux, menant à son inflammation mais aussi à l'augmentation de la sécrétion de la chémérine. Cette augmentation pourrait participer à la pathogenèse de l'obésité, ainsi qu'à la RI, par la perturbation du métabolisme du glucose et par le développement d'une inflammation chronique de bas grade. En effet, la chémérine peut induire la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires et pro-diabétiques, altérant les fonctions du tissu adipeux mais aussi la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques, comme résumé sur la Figure 13. Cependant, il n'a pas encore été établi si c'est l'augmentation de la chémérine, causée par l'obésité, qui induit une inflammation du tissu adipeux ou si c'est cette inflammation du tissu adipeux qui induit une augmentation de la production de la chémérine (Bozaoglu et al. 2007; Ernst & Sinal 2010; Catalan et al. 2013; Rourke et al. 2014).

De plus, le niveau sérique de la chémérine est fortement corrélé avec certains composants du MetS comme l'IMC, l'adiposité, les niveaux sériques de triglycérides, la résistance à l'insuline, le HDL cholestérol et l'hypertension. L'augmentation des niveaux sériques de chémérine serait également observée chez des patients atteints de diabète de type II (Bozaoglu et al. 2007; Ernst & Sinal 2010; Chu et al. 2012). Ces données suggèrent donc une réelle implication de la chémérine dans la physiopathologie de l'obésité ainsi que dans le MetS et les maladies associées. Toutefois, son rôle précis dans les mécanismes sous-jacents de l'inflammation, de l'obésité et du MetS n'a pas encore été élucidé.

Malgré le fait qu'il soit clair que la chémérine est surexprimée lors de l'obésité, les mécanismes sous-jacents de sa régulation restent peu connus. Plusieurs pistes ont été évoquées ; par exemple, les cytokines pro-inflammatoires augmenteraient la synthèse et la sécrétion de la chémérine par les adipocytes (Ernst & Sinal 2010).



**Figure 13.** Proposition du mécanisme d'action de la chémérine dans l'inflammation, l'obésité et les comorbidités associées (Ernst & Sinal 2010).

La chémérine n'est pas la seule à subir une altération de son expression lors de l'obésité. En effet, ses récepteurs CMKLR1, GPR1 et CCRL2 voient également leur expression augmenter dans cette condition (Bozaoglu et al. 2007; Ernst et al. 2010). Bien que le rôle de CMKLR1 dans le recrutement des cellules inflammatoires, la différenciation des adipocytes et l'homéostasie du glucose et des lipides soit connu, il n'en est pas de même pour GPR1 et CCRL2 (Yoshimura & Oppenheim 2011; Ernst et al. 2012; Ernst et al. 2012; Huang et al. 2016). Néanmoins, GPR1, qui possède une affinité pour la chémérine similaire à celle de CMKLR1, jouerait un rôle dans la régulation de l'homéostasie du glucose, et ce, uniquement en cas d'obésité. Ce récepteur pourrait donc avoir une fonction redondante à celle de CMKLR1, mais ne s'exprimerait qu'en cas d'obésité (Rourke et al. 2014). CCRL2, quant à lui, lierait la chémérine et permettrait sa concentration au niveau du site de l'inflammation, pour ensuite la présenter aux cellules exprimant CMKLR1, facilitant le chimiotactisme (Zabel et al. 2008; Monnier, Lewén, O'Hara, et al. 2012). Toutefois, les rôles de GPR1 et CCRL2 ne sont pas complètement élucidés et nécessitent des études complémentaires.

### 3.6.1.2. Chémérine, inflammation et stress oxydatif

Les niveaux sériques de la chémérine suivent une corrélation positive avec les marqueurs de l'inflammation, tels que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , ainsi que du stress oxydatif. Cette constatation a mené à l'hypothèse que la chémérine pourrait contribuer à l'inflammation chronique et à l'augmentation du stress oxydatif chez les individus obèses (Fulop et al. 2014; Li et al. 2014).

L'obésité est associée à une inflammation systémique chronique de bas grade, mais aussi à un stress oxydatif accru. Dans ce cas, une augmentation importante de l'infiltration du tissu

adipeux par les macrophages peut être observée, suivie par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires telle que décrite précédemment (Bozaoglu et al. 2007; Wozniak et al. 2009; Ernst & Sinal 2010; Kaur 2014). CMKLR1, étant exprimé à la surface des macrophages s'accumulant dans le tissu adipeux de personnes obèses, pourrait participer à l'inflammation du tissu adipeux, suite à son activation par la chémérine surexprimée dans le tissu adipeux en cas d'obésité. En effet, cette activation pourrait favoriser le recrutement des cellules immunitaires vers le tissu adipeux en souffrance, en lien avec l'hypertrophie et l'hypoxie, et donc provoquer une réaction inflammatoire (Suzuki et al. 2012; Mattern et al. 2014).

### 3.6.1.3. Chémérine et maladies rénales

Le rein, faisant partie des organes sécrétant la chémérine, peut donc réguler sa concentration plasmatique par sa synthèse et par son élimination. Néanmoins, la synthèse rénale reste négligeable par rapport à celle du foie et du tissu adipeux et n'a donc que peu d'impact sur sa concentration plasmatique (Bonomini & Pandolfi 2015). Au vu de ces informations, il n'est pas impossible que la chémérine ait un impact sur le rein et puisse être impliquée dans les maladies rénales, dont l'insuffisance rénale chronique induite par l'obésité. Cependant, les maladies rénales chroniques étant des pathologies très complexes, incluant de nombreux facteurs, il est délicat de supputer sur le rôle potentiel de la chémérine dans les altérations rénales.

La contribution de la chémérine aux maladies rénales doit encore être éclaircie. Une question importante reste à ce jour non élucidée : est-ce que la chémérine pourrait contribuer aux altérations de la fonction rénale ou en est-elle juste le reflet ? En effet, les niveaux sériques de la chémérine peuvent augmenter, suite à une diminution significative de sa clairance rénale. Néanmoins, des études récentes ont suggéré un lien entre la progression de l'altération de la fonction rénale et une élévation de la chémérine plasmatique. Par exemple, De Palma et al. (2011) ont observé que la chémérine, présente au niveau des cellules tubulaires du rein de patients présentant des altérations rénales, pourrait jouer un rôle dans le recrutement des cellules dendritiques à cet endroit, causant une inflammation du parenchyme rénal. De plus, l'élévation de la concentration plasmatique en chémérine, observée en cas d'obésité, est associée à une inflammation chronique et à des troubles du métabolisme du glucose et des lipides, qui sont des anomalies également rencontrées dans les maladies rénales chroniques (Ruan & Guan 2009; Rourke et al. 2015). Cependant, les mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore connus. Toute la lumière reste donc à faire sur son implication dans les maladies rénales.

### 3.6.2. Adiponectine

L'adiponectine, aussi connue sous le nom d'Acrp30 et AdipoQ est une glycoprotéine de 30 kDa. Étant principalement sécrétée par les adipocytes, cette protéine est considérée comme une adipokine. En plus de ses effets immunomodulateurs, elle possède une action sur le métabolisme du glucose et des lipides (Wozniak et al. 2009; Ziemke & Mantzoros 2010; Kukla et al. 2011; Nakamura et al. 2011; Sweiss & Sharma 2014). L'adiponectine exerce son action par l'activation de ses deux récepteurs: Adiponectin Receptor 1 (AdipoR1) et Adiponectin Receptor 2 (AdipoR2). AdipoR2 est principalement exprimé dans le foie, alors que AdipoR1 est retrouvé de façon équivalente dans tous les tissus (Angelica & Fong 2008; Kukla & Mazur 2014).

Cette hormone peptidique possède des caractéristiques anti-inflammatoires et insulino-sensibilisantes. Elle est, par exemple, capable d'accroître l'absorption du glucose, la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le foie et les muscles et d'induire l'inhibition de la néoglucogenèse dans les hépatocytes (Suzuki et al. 2012; Christou & Kiortsis 2014; Nakamura et al. 2014; Sweiss &



Sharma 2014). Cette adipokine exerce son rôle insulino-sensibilisant sur le tissu adipeux, le foie et les muscles squelettiques. Ses propriétés anti-inflammatoires dérivent de sa capacité à supprimer la sécrétion du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6, d'augmenter la synthèse de l'interleukine 10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire, mais aussi de son aptitude à induire la polarisation des macrophages inflammatoires, M1, vers un phénotype anti-inflammatoire, M2. De plus, cette adipokine possède des effets anti-athérogéniques. Effectivement, elle est capable de prévenir la formation des plaques d'athéromes par la réduction de la progression des macrophages en cellules spumeuses, mais aussi par l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses et le remodelage artériel qui est caractéristique du développement des plaques athéromateuses (Adamczak & Wiecek 2013; Felizardo et al. 2014; Kaur 2014; Nakamura et al. 2014).

L'adiponectine plasmatique voit sa concentration diminuer lors de l'obésité, des maladies cardiovasculaires et du diabète de type II (Kaur 2014; Nashar & Egan 2014). Ce phénomène peut être expliqué par différents facteurs. Par exemple, une diminution de sa synthèse est observée chez un sujet obèse en lien avec l'apparition de l'hypoxie du tissu adipeux résultant de l'adiposité viscérale, du stress oxydatif et des médiateurs inflammatoires (Rabe & Lehrke 2008; Chu et al. 2012; Felizardo et al. 2014). Un autre acteur pouvant être impliqué dans ce phénomène n'est autre que PPAR- $\gamma$ . En effet, ce facteur de transcription étant impliqué dans la production de l'adiponectine, sa diminution induirait, par conséquent, une réduction de la concentration plasmatique en adiponectine (Maeda et al. 2001; Ziemke & Mantzoros 2010). Cette diminution est associée avec la RI, l'hypertension, l'athérogénèse et la réduction de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. De plus, sa sécrétion est inversement proportionnelle au nombre de composantes du MetS telles que la dyslipidémie et l'hyper-insulinémie. Dès lors, l'adiponectine est considérée comme un marqueur de la sensibilité à l'insuline (Gil-Campos et al. 2004; Kadowaki et al. 2006; Bruce & Byrne 2009; Klunder-Klunder M et al. 2013). De façon similaire, l'expression de ses récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2, voient leurs concentrations diminuer dans un modèle murin d'obésité (Rasmussen et al. 2006).

Plusieurs études ont également montré une corrélation inverse entre les taux de chémérine et d'adiponectine sériques, suggérant que ces deux adipokines peuvent participer réciproquement au développement du MetS (Chu et al. 2012; Li et al. 2014). Par exemple, dans une étude réalisée en 2012, des sujets humains avec des concentrations plasmatiques d'adiponectine bas et des taux de chémérine élevés étaient plus susceptibles de développer le MetS (Chu et al. 2012). Un lien possible entre l'adiponectine et la chémérine pourrait être le TNF- $\alpha$ , dont la production est stimulée par l'obésité. En effet, il a été montré qu'en présence de TNF- $\alpha$ , la sécrétion d'adiponectine est réduite tandis que la sécrétion de chémérine par les adipocytes est augmentée (Rabe & Lehrke 2008; Parlee et al. 2010; Suzuki et al. 2012). Cependant, aucune interaction entre ces adipokines n'a clairement été démontrée jusqu'à présent.

Enfin, l'adiponectine est sécrétée par les adipocytes, mais aussi par les cellules tubulaires rénales (Perri et al. 2013). Cette cytokine aurait un effet protecteur sur le système rénal. En effet, différentes études ont montré que la déficience en adiponectine, comme celle observée chez les sujets obèses, est associée avec le développement d'une albuminurie, de lésions suivies d'un effacement podocytaires, d'une protéinurie, d'une fibrose interstitielle, d'une glomérulosclérose et d'un stress oxydatif des glomérules rénaux (Kalaitzidis & Siamopoulos 2011; Christou & Kiortsis 2014; Sweiss & Sharma 2014). Néanmoins, de plus amples investigations doivent être effectuées afin de définir plus exactement le rôle de l'adiponectine dans la physiopathologie des maladies rénales chroniques liées à l'obésité.



### 3.6.3. Leptine

La leptine, aussi connue sous le nom d'hormone de satiété, est une hormone digestive peptidique qui a pour rôle le contrôle de l'appétit et la régulation des réserves de graisses dans l'organisme. Chez une personne saine, la prise d'un repas induit une augmentation de la sécrétion de la leptine, induisant une diminution de la prise de nourriture et une dépense énergétique accrue. De plus, les niveaux plasmatiques de leptine suivent un rythme circadien avec un pic au milieu de la phase de repos et un niveau minimum au milieu de la phase d'éveil (Guyton & Hall 2006; Silverthorn et al. 2007).

Cette hormone est majoritairement sécrétée par le tissu adipeux blanc, lui conférant le nom d'adipokine. La régulation de sa sécrétion se fait en réponse à divers stimuli comme la prise de nourriture, l'insuline et les cytokines. En effet, il a été démontré que la production de leptine est modifiée en fonction de l'état du stockage énergétique dans le tissu adipeux blanc et de la taille des adipocytes (Silverthorn et al. 2007; Wozniak et al. 2009; Kukla et al. 2011; Alfadda 2014; Nakamura et al. 2014).

La leptine produit ses effets anorexigènes en interagissant principalement avec ses récepteurs au niveau de l'hypothalamus. Cependant, elle possède également des récepteurs dans de nombreux autres tissus, y compris le foie et les reins (Wolf et al. 2002; Schulz & Widmaier 2007; Kaur 2014). Par son interaction avec le système nerveux sympathique, elle est ainsi capable d'inhiber la prise alimentaire, de supprimer la sécrétion d'insuline et d'augmenter la lipolyse (Guyton & Hall 2006).

Chez les personnes obèses, une augmentation de sa sécrétion et de sa concentration plasmatique peut être observée, et ce, de manière proportionnelle avec la masse grasseuse. Cependant, malgré des taux circulants de leptine élevés, la leptine ne parvient pas à induire une perte de poids par ses effets anorexigènes. De cette constatation a émergé la théorie de la résistance à la leptine. Cette théorie soutient que les patients atteints d'obésité développent une résistance à la leptine induisant une perte de la sensation de satiété. Néanmoins, la leptine continue d'être sécrétée dans la circulation, menant à terme à une hyperleptinémie, pouvant engendrer des perturbations cardiovasculaires, immunologiques et métaboliques. Par exemple, elle participe à l'augmentation de la sécrétion de l'IL-6, TNF- $\alpha$ , ayant un rôle dans le développement de la RI (Nakayama & Wang 2010; Nakamura et al. 2011; Felizardo et al. 2014).

Cette résistance serait le résultat d'un défaut dans le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique vers ses récepteurs hypothalamiques, d'un défaut de la signalisation de ses récepteurs ou du blocage de la transduction du signal (Wozniak et al. 2009). Ce phénomène mènerait à une accumulation excessive de triglycérides dans le tissu adipeux, les muscles, le foie et le pancréas, menant à une RI alors qu'en situation physiologique, la leptine augmente la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. Cette hypothèse est étayée par le fait que des souris Ob/Ob, mutées pour le gène de la leptine, développent une obésité associée à une hyperphagie, une hyperinsulinémie et hypertriglycéridémie (Wolf et al. 2002; Fishman et al. 2007; Yadav et al. 2013; Röss & Kaser 2016).

La leptine, étant éliminée par les reins, a de nombreux effets pro-inflammatoires et pro-oxydants sur ces derniers, menant à l'apparition de lésions rénales. De plus, par son action hypertensive, via une sur-activation du système nerveux sympathique rénal, cette hormone peut provoquer des lésions rénales. En outre, les rats recevant des injections de leptine développent une protéinurie, mais aussi une prolifération des cellules endothéliales du glomérule et une production de collagène de type I et IV induite par le TGF- $\beta$ , entraînant ainsi une

glomérulosclérose (Wolf et al. 1999). En effet, la leptine possède la capacité d'augmenter la production du TGF- $\beta$ , un médiateur fibrogénique, par les monocytes/macrophages. Cette action pro-fibrotique de la leptine peut ainsi mener à terme à une glomérulopathie caractérisée par une glomérulosclérose (Wolf et al. 1999; Praga et al. 2000; Wolf et al. 2002; Prasad 2014).

### 4. Objectifs du mémoire

Étant donné que l'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses maladies, comme l'insuffisance rénale chronique, les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II, elle est aujourd'hui considérée comme un problème de santé publique (Nakayama & Wang 2010). L'augmentation croissante de la prévalence de l'obésité et maladies rénales associées poussent les chercheurs à s'intéresser à cette pathologie afin de déterminer les mécanismes par lesquels l'obésité se développe et induit ses complications.

Pour tenter d'apporter des réponses à ces questions, des souris C57Bl/6 âgées de 8 semaines ont été divisées en trois groupes expérimentaux suivant leur régime alimentaire : un régime pauvre en graisse (Low-Fat Diet - LFD), un régime riche en graisse (High-Fat Diet - HFD) et un régime riche en graisse avec une eau de boisson enrichie avec 30% de fructose (High-Fat Diet Fructose - HFDF). Ce protocole induirait des détériorations au niveau de différents organes, dont le rein, semblables à celles observées chez l'homme.

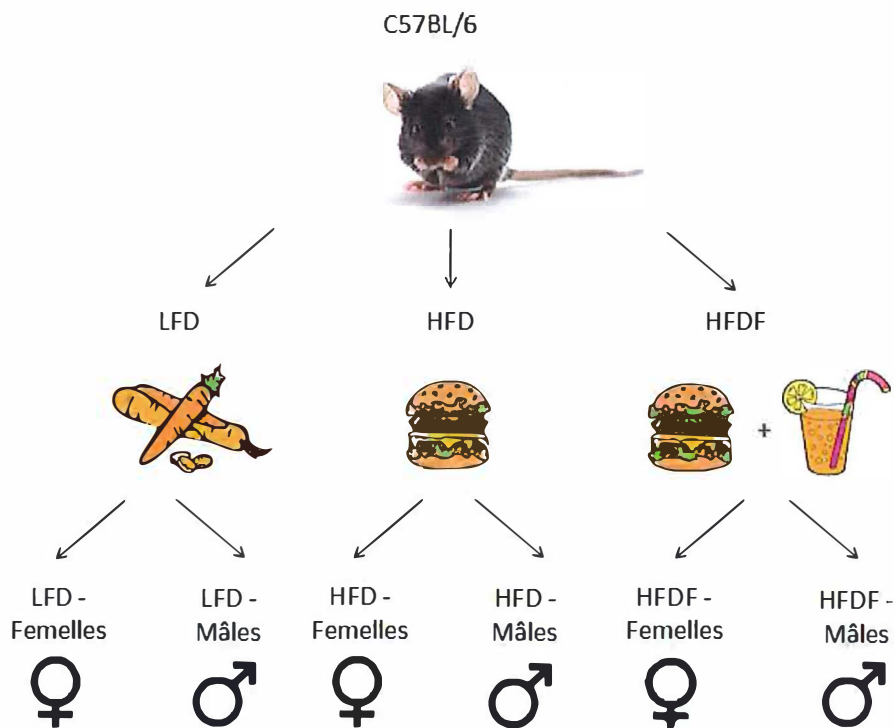
La première partie de ce mémoire consiste en la caractérisation de notre modèle d'obésité induite par le régime alimentaire dans une modèle murin C57Bl/6 pour confirmer si les régimes HFD et HFDF peuvent induire des altérations métaboliques similaires à celles observées chez les patients obèses, mais aussi pour évaluer les différences entre les différents groupes concernant la structure et la fonction rénale. De plus, tout au long de la description des résultats, une comparaison mâles/femelles sera effectuée afin de mettre en évidence les différences liées au genre qui peuvent intervenir dans les processus d'obésité induite par l'alimentation. Récemment, il a été proposé que la chémérine puisse être impliquée dans la néphropathie induite par l'obésité. La seconde partie du mémoire traitera donc de l'évaluation de l'implication de la chémérine, mais aussi de la leptine et l'adiponectine, dans la néphropathie induite par un régime riche en graisse. Enfin, la dernière partie de ce mémoire évaluera l'impact de l'obésité induite par le régime alimentaire sur l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose qui sont trois conséquences importantes observées en cas d'obésité.

# **Matériels et méthodes**

## 1. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur 38 souris C57BL/6 mâles et femelles (Janvier - France), âgées de 8 semaines. Toutes les procédures animales ont été approuvées par le comité d'éthique animal local « Bien-être et santé des animaux d'expérience » de l'UNamur. Les souris ont été hébergées dans un local climatisé à 21 °C et dont l'humidité était contrôlée. De plus, l'éclairage de ce local suivait un cycle jour/nuit de 12h/12h. Afin d'étudier l'impact du régime alimentaire et du sexe sur la physiologie rénale, les animaux ont été divisés aléatoirement en six groupes expérimentaux suivant leur régime alimentaire et leur sexe (Figure 14) :

- Le groupe **LFD** : Deux groupes composés de six souris mâles et six souris femelles ont été nourries avec un régime pauvre en graisses (low-fat diet – **LFD**), provenant de la firme Research Diet (New Brunswick, NJ – USA). Ce régime contient 10 % de graisse, 20 % de protéines et 70 % de glucides (en % Kcal – D12450J).
- Le groupe **HFD** : Deux groupes composés de six souris mâles et six souris femelles ont été nourries avec un régime riche en graisse (high-fat diet – **HFD**), provenant de la firme Research Diet (New Brunswick, NJ – USA). Ce régime contient 60 % de graisse, 20 % de protéines et 20 % de glucides (en % Kcal – D12492).
- Le groupe **HFDF** : Deux groupes composés de sept souris mâles et sept souris femelles ont été nourries avec un régime riche en graisse contenant 60 % de graisse, 20 % de protéines et 20 % de glucides (en % Kcal – D12492), provenant de la firme Research Diet (New Brunswick, NJ – USA). De plus, dans ce régime, du fructose en solution à 30 % a été ajouté dans l'eau de boisson (Sigma-Aldrich –USA) (high-fat diet fructose - **HFDF**).



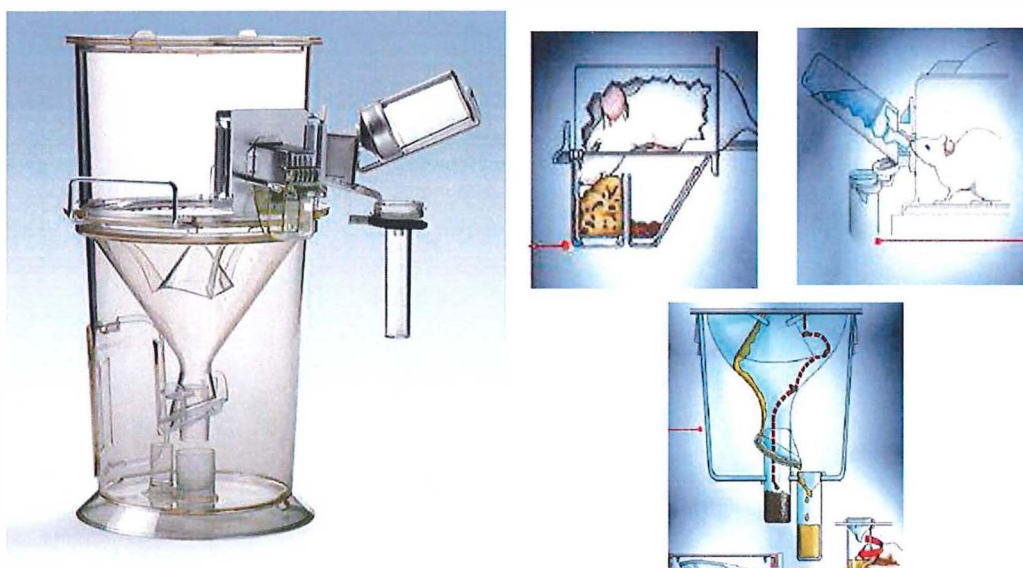
**Figure 14.** Représentation des différents groupes expérimentaux. Les animaux ont été répartis en six groupes distincts suivant leur régime alimentaire et leur sexe.



Ces animaux ont eu un accès ad libitum à la nourriture décrite ci-dessus, mais aussi à l'eau de boisson renouvelée quotidiennement, durant toute la procédure expérimentale qui a couvert une période de 16 semaines.

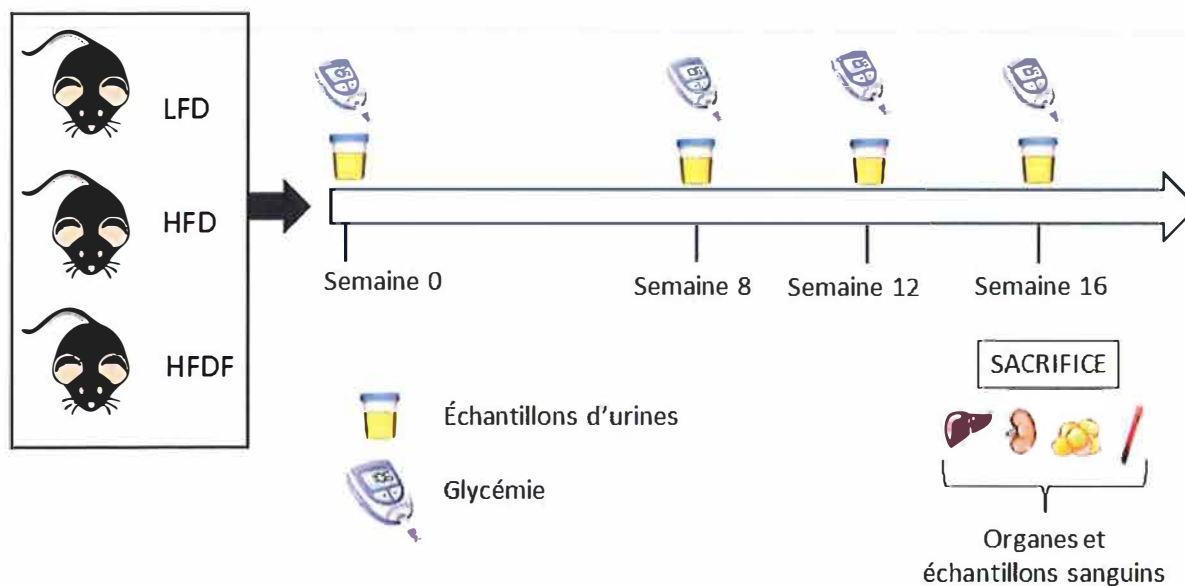
### 2. Fonction rénale et données métaboliques

Aux semaines 0, 8, 12 et 16, les souris ont été placées dans des cages métaboliques pendant une période de 48h, permettant de recueillir l'urine afin de caractériser la fonction rénale (Figure 15). Ces dispositifs permettent de déterminer le volume urinaire excrété ainsi que la quantité de nourriture et d'eau absorbée. Pour éviter la perte potentielle des urines par évaporation et s'assurer d'une récolte optimale des échantillons, 1 mL de paraffine liquide (VWR – Belgique) est ajouté aux compartiments récoltant les urines, avant son utilisation. Par ailleurs, les échantillons d'urine ainsi récoltés sont ensuite centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les impuretés et la paraffine liquide contenue dans les tubes de récolte. Enfin, l'urine récoltée est aliquotée (100  $\mu$ L par eppendorfs) et stockée à -80°C jusqu'à son utilisation pour effectuer des analyses.



**Figure 15.** Cage métabolique.

Aux mêmes moments, des mesures du poids corporel de chaque souris et de la concentration en glucose plasmatique après six heures de mise à jeun, ont été réalisées (Figure 16). La glycémie a été mesurée à l'aide d'un système d'auto-surveillance de la glycémie. Une goutte de sang, provenant de la veine caudale de la queue, est déposée sur le capillaire de la bande réactive. Cette dernière est ensuite introduite dans le lecteur OneTouch® Vita<sup>TM</sup> (LifeScan - Etats-Unis), affichant la glycémie en mg/dL.



**Figure 16.** Schéma du protocole expérimental. Les souris provenant des différents groupes expérimentaux (LFD : Low-Fat Diet ; HFD : High-Fat Diet ; HFDF : High-Fat Diet Fructose) sont placées en cages métaboliques aux semaines 0, 8, 12 et 16, afin de collecter l'urine et de mesurer la prise alimentaire et la quantité d'eau absorbée. Par la même occasion, la glycémie a été mesurée. À la semaine 16, les animaux ont été sacrifiés afin de récupérer leurs organes et des échantillons sanguins.

## 3. Échantillons biologiques

À la fin du protocole expérimental, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/kg, SEVA – Belgique) et de médétomidine (0,5 mg/kg, Bayer – Belgique). Les animaux ont ensuite été euthanasiés par ponction intracardiaque, permettant le prélèvement d'un volume maximum d'échantillon sanguin. Après cela, les souris ont subi une dislocation des cervicales afin de pratiquer une double euthanasie.

Les échantillons de sang, récoltés dans des tubes héparinés, ont été centrifugés à 2500 rpm, pendant 10 minutes à 4°C, pour séparer le plasma des éléments figurés du sang. Celui-ci a ensuite été aliquoté et stocké à -80°C jusqu'à utilisation. De plus, les deux reins, le foie, le cœur et le tissu adipeux blanc (graisse viscérale et graisse péri-rénale), de chaque souris, ont été prélevés et pesés. Le tibia droit a également été mesuré dans le but de normaliser les valeurs obtenues pour les poids des organes collectés. Les organes ainsi obtenus, ont été disséqués et conservés de différentes manières suivant les analyses à effectuer. Une partie des organes prélevés ont été fixés par immersion du tissu dans une solution d'alcool Bouin (220 mL d'eau distillée, 260 mL de formol 40 %, 70 mL d'acide acétique glacial, 0,675 g d'acide picrique et 450 mL d'éthanol absolu) pendant 48 heures, avant d'être déshydratés puis enrobés dans de la paraffine. Cette méthode de fixation permet ensuite de réaliser des analyses histologiques et immunohistochimiques. Les morceaux de tissus restants ont été congelés rapidement dans de l'azote liquide et stockés dans des eppendorfs à -80°C pour des analyses ultérieures.

## 4. Analyses histologiques et immunohistochimiques

### 4.1. Prétraitements

Après la fixation dans une solution d'alcool Bouin, les tissus fixés ont été déshydratés par immersion dans de l'éthanol pendant 24 heures, puis dans du butanol pendant 24 heures, en

renouvelant trois fois ces deux solutions sur 24 heures. Par la suite, les tissus ont été enrobés dans de la paraffine. Cette étape se réalise en plongeant les tissus précédemment déshydratés dans un bain de paraffine liquide à une température de 60°C pendant trois jours successifs, à raison d'un bain par jour. Les tissus ont ensuite été enrobés dans un bloc de paraffine fraîche afin de réaliser les coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome (Leica RM2155 Microtome – Wetzlar, Allemagne). Les sections d'organes ainsi obtenues ont ensuite été placées sur une goutte d'eau sur une lame porte objet silanée (3-aminopropyl triméthoxysilane 98 %, Sigma, USA), pour permettre une meilleure adhésion du tissu sur le verre. Afin de permettre une évaporation complète de l'eau se trouvant entre la lame et le tissu, ces lames sont finalement posées sur une plaque chauffante à 35°C.

Une fois toutes ces étapes réalisées, les lames peuvent être utilisées pour des analyses histologiques et immunohistochimiques. Néanmoins, avant ces traitements, un déparaffinage classique est nécessaire. Pour ce faire, les sections de tissus sont immergées dans deux bains successifs de toluène, ainsi que trois bains successifs d'éthanol, à raison de trois minutes par bain. Enfin, une étape de réhydratation du tissu est réalisée en plaçant les lames dans un bain d'eau courante durant 10 minutes.

### 4.2. Histologie

#### 4.2.1. Coloration au PAS

L'analyse histologique a été réalisée sur des coupes de reins colorées à l'aide de l'Acide Périodique de Schiff (PAS– Pararissiline 1 %, Sigma – USA) et de l'hémalum (Hématoxyline Mayer, J.T. Baker – Pays-Bas), afin d'évaluer la morphologie du rein et de mettre en évidence les changements potentiels de la structure rénale. Le PAS permet de mettre en évidence les polysaccharides et donc les différentes structures en rose.

Pour ce faire, les lames déparaffinées sont immergées dans l'acide périodique 1 % pendant 8 minutes, avant de subir un rinçage dans un bain d'eau distillée. Ensuite, ces lames sont plongées pendant 3 minutes dans un bain de PAS puis sont rincées pendant 10 minutes à l'eau courante. Par la suite, les sections de tissus sont placées pendant 45 secondes dans l'hémalum, un colorant mettant en évidence les noyaux en brun. Les lames sont rincées sous l'eau courante durant 5 minutes, avant d'être immergées dans un bain d'éthanol absolu pendant une seconde. Les lames sont ensuite immergées dans du bleu de Luxol (0,1 % dans de l'alcool 95°, Luxol fast blue, Alfa Aesar® – Allemagne) pendant 1 minute, permettant une coloration du cytoplasme en bleu. Pour finir, les lames subissent une déshydratation par leur passage dans trois bains successifs d'éthanol suivi d'un bain de butanol et deux bains de toluène.

Finalement, les lames sont montées afin d'être observées au microscope optique. Pour ce faire, une goutte de colle hydrophobe (HistoChoice® Mounting Media (H157 – 120 mL), AMRESCO – USA) est placée sur le tissu. Après quoi une lamelle couvre-objet, est posée sur la section.

#### Analyse de l'histologie des glomérules

Après le montage des lames, dix glomérules par animal sélectionnés au hasard, ont été photographiés au grossissement 400x. Ces images ont été analysées en double aveugle de façon quantitative avec le logiciel Image J. Ce logiciel permet d'appliquer une grille de 2500 pixels<sup>2</sup> sur l'image photographiée du glomérule. Il faut ensuite déterminer sur quelle structure est appliquée chaque intersection de la grille, c'est-à-dire, de la matrice mésangiale, la lumière des capillaires ou un noyau. Au terme cette méthode permet la détermination de la surface



occupée par les différentes structures au sein du glomérule. La surface glomérulaire est ensuite calculée par l'addition des valeurs obtenues de toutes les intersections reposant sur la surface glomérulaire. Cette méthode permet de déterminer si une altération morphologique du glomérule est observée.

### 4.2.2. Coloration au rouge picrosirius

Le développement de la fibrose rénale a été évalué en utilisant la coloration au rouge picrosirius (RAL Diagnostics - France) sur des coupes de rein. Pour ce faire, les sections de tissus sont plongées dans l'acide phosphomolybdique (Merck – Allemagne) pendant 5 min, avant d'être placées dans le rouge picrosirius (3g d'acide picrique (Sigma-Aldrich –USA) et 250 mg de rouge picrosirius (RAL Diagnostics – France) dans 250 mL d'eau distillée). Ensuite, les lames sont immergées pendant 2 minutes dans une solution d'HCl-Alcool (300 ml EtOH 70 % (UNIVAR – USA) et 3 ml HCl 0.01M (VWR Chemicals – Belgique)), puis pendant 1 minute dans de l'éthanol 70 %. Pour finir, les sections subissent une déshydratation par leur passage dans trois bains successifs d'éthanol suivi d'un bain de butanol et deux bains de toluène.

Les sections de tissus sont ensuite montées entre une lame et une lamelle afin d'être observée au microscope optique. Après le montage des lames, dix champs par animal au grossissement 400x, sélectionnés au hasard, ont été analysés en double aveugle avec le logiciel Image J. Ce programme permet de quantifier la surface du champ coloré par le rouge picrosirius.

### 4.3. Immunohistochimie

Un immunomarquage des macrophages a été réalisé sur des coupes de reins en utilisant un anticorps primaire ainsi qu'un anticorps secondaire spécifiques (Table 1). Cette méthode permet de mettre en évidence les macrophages dans un tissu biologique.

|                                | Anticorps primaire   | Anticorps secondaire   |
|--------------------------------|--|--|
| Immunomarquage des macrophages | Macrophage rat antibody<br>ab56297 (Abcam – UK)<br><br>Temps d'incubation :<br>overnight<br><br>Dilution 1/100 | Goat anti-rat IgG : biotin<br>star 131b (Bio-rad – USA)<br><br>Temps d'incubation : 30<br>minutes<br><br>Dilution 1/50 |

**Table 1.** Anticorps primaire et secondaire utilisés pour réaliser l'immunohistochimie des macrophages.

### Prétraitement

Pour réaliser cette technique de marquage, les tissus, préalablement déparaffinés, subissent un démasquage au tampon citrate 0,01M (Sigma-Aldrich, USA) selon le protocole suivant : 3 minutes à 800W au micro-onde suivi de 10 minutes sur defrost et enfin un refroidissement à température ambiante durant 20 minutes. Cette étape permet de démasquer les antigènes qui auraient pu être cachés par la fixation et seraient donc inaccessibles aux anticorps. Les lames sont alors plongées pendant 15 minutes dans un bain de peroxyde d'hydrogène à 0,06 % (Merk, KGaA – Allemagne) afin de faire disparaître les peroxydases endogènes pouvant réagir avec la solution de révélation. Les lames sont ensuite rincées dans un bain d'eau distillée puis dans un tampon « Phosphate Buffered Saline » (PBS ; 0,04 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ; 0,01 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0,12 mol/L NaCl).



Par après, 30  $\mu$ L d'avidine diluée 1/100 (Vector laboratories –USA) sont déposés sur le tissu pendant 30 minutes. L'avidine ainsi apportée se lie à la biotine endogène présente dans le tissu. Après un bain de PBS permettant de retirer l'excédent d'avidine, 30  $\mu$ L de biotine diluée 1/100 (Vector laboratories – USA) sont appliqués sur le tissu durant 30 minutes afin que cette biotine sature tous les sites non-biotinylés de l'avidine. Cette étape est réalisée dans le but de réduire l'éventuel bruit de fond que l'on pourrait observer par la liaison aspécifique de l'anticorps secondaire sur un des quatre sites de liaison de l'avidine. Ensuite, après un rinçage dans un bain de PBS, de la caséine (0,5 % dans une solution saline de tampon phosphate ; Sigma – USA) est placée sur la coupe pendant une heure pour diminuer le potentiel bruit de fond que l'on pourrait observer, en saturant les sites aspécifiques du tissu que l'anticorps pourrait reconnaître.

### Immunohistochimie

L'immunohistochimie, à proprement parler, commence par le dépôt de l'anticorps primaire spécifique de notre protéine d'intérêt sur les sections de reins. Cet anticorps est incubé pendant la nuit, en chambre froide. Ensuite, après un bain dans le PBS, l'anticorps secondaire, reconnaissant spécifiquement l'anticorps primaire, est déposé sur la coupe durant un temps d'incubation de 30 minutes. La procédure se poursuit avec la pose de la streptavidine HRP (HorseRadish Peroxidase ; Dako – Danemark) durant 30 minutes, permettant l'amplification du signal.

L'étape de révélation a été réalisée en utilisant une solution constituée de peroxyde d'hydrogène (0,002 %) et de DAB (0,05 %) (3'-diaminobenzidine ; Vector laboratories – USA) permettant de visualiser l'activité de la peroxydase. En effet, la réaction entre les peroxydases et le peroxyde d'hydrogène permet l'oxydation du DAB, formant un précipité de couleur brune, visible au microscope. Une fois que le marquage est assez important, la réaction est arrêtée en plaçant les lames dans un bain d'eau distillée. Une contre-coloration des lames est enfin réalisée à l'aide de l'hémalum, marquant les noyaux en brun, et du bleu de Luxol, colorant les cytoplasmes en bleu.

Les lames sont ensuite montées entre une lame et une lamelle afin d'être observée au microscope optique. Le comptage des macrophages a été réalisé dans le but de mettre en évidence une inflammation du tissu rénal. Après le montage des lames, dix champs par animal au grossissement 400x, sélectionnés au hasard, ont été analysés à l'aveugle à l'aide du logiciel Image J, par le pointage des cellules positives au marquage immunohistochimique.

## 5. Analyse des échantillons biologiques

Afin d'évaluer la fonction rénale, plusieurs paramètres ont été examinés à partir des homogénats de reins ainsi que des échantillons urinaires et plasmatiques récoltés.

### 5.1. Concentration en urée plasmatique

Afin d'évaluer la fonction rénale, les concentrations plasmatiques en urée ont été mesurées, en utilisant le kit de dosage de l'urée DIUR-100 Quantichrom™ (Bioassay systems BUN – USA) selon les procédures du fabricant. Ce dosage mesure la quantité d'urée dans les échantillons par la formation d'un complexe coloré entre un réactif chromogène et l'urée. L'absorbance du complexe ainsi formé est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Molecular devices - versa max Microplate reader – USA) à une longueur d'onde de 520 nm. Elle est directement proportionnelle à la concentration en urée (mg/dL) de l'échantillon qui est déterminée à partir de la droite d'étalonnage.

### 5.2. Concentration en créatinine plasmatique et urinaire

La concentration en créatinine plasmatique a été déterminée par une chromatographie liquide à haute performance (Binary HPLC Pump – Waters, USA) en collaboration avec l'unité de recherche en néphrologie expérimentale (ULB, Bruxelles). Les valeurs obtenues donnent une indication sur la fonction rénale et permettent une estimation du DFG.

La créatinine urinaire (mg/dL), quant à elle, a été déterminée grâce au Kit « Creatinine colorimetric detection » (Enzo life sciences – Belgique). Pour ce faire, les échantillons sont déposés sur une microplaque. Ensuite, l'agent réactif de détection est ajouté aux puits afin de permettre une réaction colorimétrique, directement proportionnelle à la quantité de créatinine présente dans les échantillons. L'absorbance des échantillons est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. La concentration en créatinine des échantillons est enfin déterminée grâce à la courbe d'échantillons standards.

### 5.3. Concentration urinaire en albumine

Les niveaux d'albumine urinaire ( $\mu\text{g/mL}$ ) ont été examinés dans le but d'évaluer la détérioration de la fonction rénale. Pour cela, un kit ELISA de type compétitif (Albuwell M Exocell –USA) a été utilisé, selon les procédures du fabricant. Dans ce dosage, nos échantillons d'urine sont placés dans les puits pré-coatés d'albumine. Ensuite un anticorps dirigé contre l'albumine de souris est ajouté dans ces puits. Ainsi, une compétition entre l'albumine immobilisée dans des puits et l'albumine libre se trouvant dans les échantillons se produit. Il est donc aisé de comprendre que plus il y aura d'albumine dans notre échantillon, moins l'anticorps aura tendance à se lier à l'albumine coatée dans les puits. Après le lavage des puits, seule l'albumine coatée persiste dans les puits. Enfin, un système de détection, couplé à l'anticorps, permet de mettre en évidence la quantité d'albumine coatée dans les puits couplée à l'anticorps. Ainsi, l'absorbance, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm, est inversement proportionnelle à la quantité d'albumine présente dans notre échantillon. L'absorbance, obtenue par le spectrophotomètre, est ensuite convertie, grâce à la courbe standard de quantités connues d'albumine, en concentration en albumine. Ces valeurs de concentrations sont enfin exprimées en mg d'albumine / mg de créatinine urinaire.

### 5.4. Mesure du peroxyde d'hydrogène urinaire

La concentration en peroxyde d'hydrogène ( $\mu\text{mol} / 24\text{h}$ ) a été évaluée sur les échantillons d'urine avec le kit de dosage Amplex red Assay (Amplex® red hydrogen/peroxidase assay kit –USA). Le dosage « Amplex red Assay » est un test colorimétrique au cours duquel un produit d'oxydation rouge fluorescent, la résorfine, est produit par la réaction entre les réactifs « Amplex Red » et l' $\text{H}_2\text{O}_2$  libéré par les échantillons biologiques. Un spectrophotomètre est ensuite utilisé pour mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 590 nm. La concentration en peroxyde d'hydrogène des échantillons est déterminée à l'aide de la courbe d'échantillons standards.

### 5.5. Mesure de l'osmolarité urinaire

L'osmolarité (mOsm/L) des échantillons d'urine a été mesurée sur la base du principe de « freezing point depression » (FDP), avec un micro-osmomètre (Fiske® 210 Micro-Sample Osmometer – USA). Cette technique dérive de l'analyse du point de congélation d'une solution ou « freezing point », qui varie en fonction du nombre de particules présentes dans la

solution. Effectivement, plus l'échantillon est concentré, plus la température du point de congélation diminue.

### 5.6. Mesure de la protéinurie

La protéinurie ( $\mu\text{g}/24\text{h}$ ) a été mesurée, selon la méthode de Bradford, après l'ajout de bleu de coomassie (Coomassie Brilliant blue 20 % – Met OH:H<sub>2</sub>O 72 % - acide acétique glacial 8 %) aux échantillons d'urines dilués (1/750). Le bleu de Coomassie voit son absorbance modifiée suite à sa liaison avec les protéines présentes dans les échantillons. Cette absorbance est ensuite lue avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 640 nm. La concentration en protéines des échantillons est enfin calculée à l'aide de la courbe d'échantillons standard.

### 5.7. Concentration en insuline plasmatique

La concentration en insuline plasmatique a été déterminée par un dosage ELISA (Rat / Mouse Insulin ELISA, EMD Millipore – USA) sur des échantillons de plasma. Ce dosage est basé sur une technique de sandwich d'immuno-dosage enzymatique quantitatif dans lequel l'insuline présente dans les échantillons est liée par des anticorps monoclonaux pré-coatés sur une microplaque. Un deuxième anticorps polyclonal biotinylé est ajouté pour induire une réaction colorimétrique, en présence de streptavidine HRP et du substrat 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine. Cette réaction colorimétrique est directement proportionnelle à la concentration en insuline présente dans l'échantillon. Après l'ajout de la solution stop (HCl 0,3M), l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 590 nm avec un spectrophotomètre et soustraite des valeurs mesurées à une longueur d'onde de 450 nm, pour minimiser les erreurs de mesure. La concentration en insuline des échantillons, exprimée en ng/mL, est calculée à l'aide de la courbe d'échantillons standard.

### 5.8. Homogénéisation des tissus

Afin de réaliser plusieurs dosages, les morceaux de rein, préalablement découpés et conservés à -80°C ont été homogénéisés à l'aide d'un potter électrique (Bioblock Scientific – France) dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology – USA) dilué 10 fois, permettant la lyse cellulaire. Dans ce tampon est également ajouté 5  $\mu\text{L}$  d'un inhibiteur de protéase (Sigma Protease Inhibitor Cocktail, Sigma – USA) afin d'éviter une dégradation des protéines par les protéases endogènes. L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000 rpm à 4°C durant 15 min. Le surnageant est récolté et placé dans un nouvel eppendorf, conservé à -80°C.

### 5.9. Concentrations en adipokines plasmatiques et tissulaires

Les concentrations plasmatiques en chémérine, en adiponectine et en leptine, ainsi qu'en adiponectine rénale ont été déterminées par des tests ELISA (Mouse Chemerin Immunoassay Quantikine® ELISA – R&D Systems Europe ; Mouse Adiponectin/Acrp30 Immunoassay Quantikine® ELISA – R&D Systems Europe ; Mouse/Rat Leptin Immunoassay Quantikine® ELISA – R&D Systems Europe, respectivement).

Ces dosages sont basés sur une technique de sandwich d'immuno-dosage enzymatique quantitatif dans lesquels l'adipokine d'intérêt présente dans les échantillons est liée par des anticorps spécifiques coatés sur une microplaque. Un second anticorps spécifique lié à une enzyme est ajouté et se lie à l'adipokine précédemment captée. Les molécules non-liées sont ensuite lavées. Le substrat de l'enzyme, lié à l'anticorps secondaire, permet une réaction colorimétrique proportionnelle à la concentration en adipokine de souris dans les échantillons. Les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde de 570 nm avec un



spectrophotomètre et soustraites des valeurs mesurées à une longueur d'onde de 450 nm. Les concentrations obtenues, calculées à l'aide de la droite d'étalonnage, sont exprimées en ng/mL.

### 5.10. Western blot

Des analyses par western blot ont été réalisées afin de détecter la présence de CMKLR1 dans le rein, d'une manière semi-quantitative. Cette quantification a ensuite été rapportée à l'expression de la GAPDH.

#### Dosage protéique

Après avoir homogénéisé les tissus rénaux comme décrit précédemment, les taux de protéines totales des échantillons ont été dosés à l'aide du kit « pierce BCA protein assay » (Thermo Scientific – USA). Cette étape est réalisée dans le but de calculer le volume d'homogénat nécessaire pour obtenir 30 µg de protéines par échantillon. Après l'ajout des échantillons dans les puits d'une plaque 96 puits, le « working reagent » est ajouté. Puis la plaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes. Le « working reagent » forme un composé violet en réagissant avec les protéines contenues dans les échantillons, et ce de façon proportionnelle avec la concentration en protéines. Les absorbances sont ainsi mesurées à une longueur d'onde de 562 nm avec un spectrophotomètre. Les concentrations obtenues, calculées à l'aide de la droite d'étalonnage, sont exprimées en µg/mL.

#### Préparation des gels

La migration des échantillons permettant de séparer les protéines suivant leur poids moléculaire s'effectue dans un gel de migration. Ce dernier est composé d'eau, d'acrylamide 30 %, de Tris HCl 2M, de Sodium Dodecyl Sulfate 10 % (SDS), de persulfate d'ammonium 10 % (APS) ainsi que de Tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Les gels réalisés possèdent 12 % d'acrylamide afin d'avoir un degré de polymérisation suffisant pour une séparation optimale de nos protéines d'intérêt. Les proportions des différents composants de ce gel sont détaillées dans la Table 2. À noter que le TEMED est à ajouter en dernier lieu car il permet la polymérisation du gel. Le gel non polymérisé est ainsi inséré entre deux vitres en verre.

Néanmoins, un autre gel est nécessaire pour permettre le tassement des protéines dans le fond des puits avant leur migration et la séparation à proprement parler. Ce dernier s'appelle le gel de chargement et est constitué des mêmes composants que le gel de migration mais en proportions différentes (Table 2). Ce gel, non polymérisé, est inséré au-dessus du gel de migration après la polymérisation de ce dernier. Des peignes sont placés dans le gel de chargement afin de créer les puits où seront placés les échantillons.

| Gel de migration (12 %) | Composés (proportion en %) |
|-------------------------|----------------------------|
|                         | H <sub>2</sub> O 39,3 %    |
|                         | Acrylamide 30% 40 %        |
|                         | Tris-HCl 2MpH 8,8 18,7 %   |
|                         | SDS 10% 1 %                |
|                         | APS 10% 1 %                |
|                         | TEMED 0,08 %               |



| Gel de chargement | Composés (proportion en %) |
|-------------------|----------------------------|
|                   | H <sub>2</sub> O 56 %      |
|                   | Acrylamide 30% 16,6 %      |
|                   | Tris-HCl 2MpH 8,8 25 %     |
|                   | SDS 10% 1 %                |
|                   | APS 10% 1 %                |
|                   | TEMED 0,1 %                |

**Table 2.** Proportion des composants des deux gels nécessaires à la migration des échantillons dans le western blot.

### Préparation des échantillons

30 µg de protéines sont placées dans chaque puit. Pour ce faire, un volume variable d'un échantillon à l'autre d'homogénat est prélevé. À ceci est ajouté 3 µL d'une solution alourdissante contenant du dithiothréitol (DTT ; Sigma-Aldrich – USA), permettant la réduction des ponts disulfures des protéines. Cette solution alourdissante contient également du bromophénol (Sigma-Aldrich – USA), colorant en bleu nos échantillons afin de suivre leur migration dans le gel. Ce volume est complété par de l'eau distillée pour arriver à un volume final de 15 µL. Ces échantillons ont enfin été bouillis 2 minutes et centrifugés avant d'être chargés dans les puits.

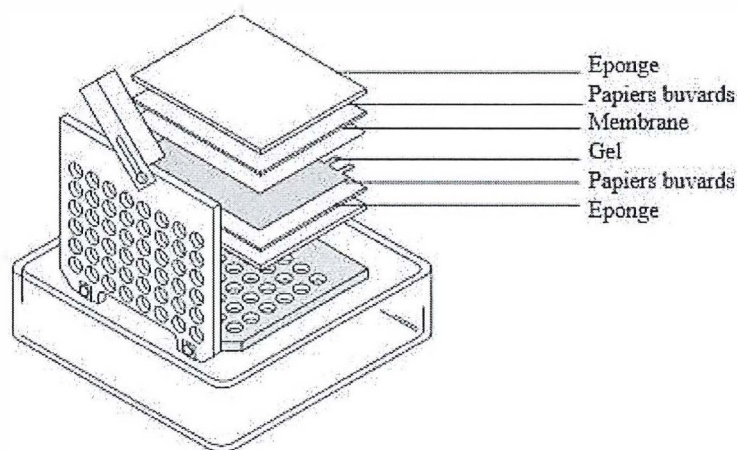
### Migration des échantillons

Les gels sont ensuite immergés dans une cuve contenant du tampon de migration, composé de Tris, glycine et SDS. 5 µL de l'étalon Kaléidoscope (Precision Plus Protein TM Standard ; BioRad – USA) sont ajoutés dans un des puits afin de fournir un repère de poids moléculaire précis. Les 15 µL d'échantillon sont déposés dans leurs puits respectifs et un voltage constant de 150V est appliqué afin de faire migrer les protéines. Le temps de migration dépend du degré de séparation entre les bandes que l'on désire et est donc variable d'une manipulation à l'autre.

### Transfert

Le transfert sur une membrane polyvinylidène fluoride (PVDF ; VWR – Belgique) a été effectué afin de concentrer les protéines, maximisant le signal observé. Pour ce faire, deux éponges et six papiers buvards par gel, ainsi que les gels ont été plongés dans du tampon de transfert, composé de Tris, de glycine et de méthanol. Pendant ce temps, la membrane PVDF a été traitée au méthanol pendant une minute, avant d'être rincée à l'eau distillée puis elle a également été plongée dans le tampon de transfert. Cette étape est réalisée dans le but de l'activer afin qu'elle puisse fixer les protéines. Le montage du sandwich nécessaire à la réalisation du transfert a été réalisé comme suit (Figure 17) :

- Une éponge
- Trois papiers buvards superposés
- Le gel
- La membrane PVDF
- Trois papiers buvards
- Une éponge



**Figure 17.** Image représentant le montage du sandwich nécessaire à la réalisation du transfert. Image modifiée de <http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html>.

Le sandwich est ensuite immergé, dans du tampon de transfert, dans la cuve. Le transfert est alors réalisé pendant 45 minutes sous ampérage constant à 0,30A.

## Blocage

Après l'étape de transfert, une étape de blocage est réalisée dans le but de saturer les sites antigéniques aspécifiques et ainsi éviter un éventuel bruit de fond. La membrane est donc immergée dans du lait 5 % dilué dans du PBS-Tween durant 30 minutes.

## Anticorps

Par la suite, 5mL d'anticorps primaire (Table 3), dilué dans du PBS-Tween et du lait 5 %, a été placé sur la membrane pour une incubation d'une nuit à 4°C sous agitation constante. Trois étapes de lavage de l'anticorps, au « Tris-Buffered Saline-Tween » (TBS-Tween), ont ensuite été réalisées avant de placer l'anticorps secondaire sur la membrane (Table 3), également dilué dans du PBS-Tween et du lait 5 %, pour une incubation d'une heure à température ambiante. Trois dernières étapes de lavage de l'anticorps, au TBS-Tween, ont ensuite été réalisées avant d'effectuer l'étape de révélation.

|        | Anticorps primaire  | Anticorps secondaire  |
|--------|---|---|
| CMKLR1 | CMKLR1 rabbit antibody<br>ab203384 (Abcam – Royaume-Uni)<br>Dilution : 1/1000 | Polyclonal Goat Anti-Rabbit immunoglobulins /<br>HRP (Dako – Heverlee, Belgique)<br>Dilution : 1/3000 |
| GAPDH  | GAPDH mouse antibody G8795<br>(Sigma –USA)<br>Dilution : 1/6000               | Polyclonal Goat Anti-Mouse immunoglobulins /<br>HRP (Dako – Heverlee, Belgique)<br>Dilution : 1/3000  |

**Table 3.** Anticorps utilisés pour réaliser le western blot.

### Révélation

La révélation a finalement été réalisée en utilisant le Western Lightning™ Enhanced Luminol Reagent Plus kit (Bio-rad – USA) et le film photo Amersham Hyperfilm™ ECL film (ThermoFisher – USA). Pour ce faire, la membrane PVDF a été incubée durant 5 minutes dans la solution substrat de révélation Western Lightning™ plus ECL. Cette membrane est ensuite placée dans une cassette étanche à la lumière. Par la suite, à l'abri de la lumière, un film photo est placé dans la cassette, sur la membrane, pour une durée variable suivant l'intensité du signal. Enfin, le film est récupéré et déposé dans la machine de révélation (Fuji Photo Film CO., LTD – Japon), permettant de développer le film photo et de visualiser le signal.

### Lavage de la membrane

Dans le but de semi-quantifier une autre protéine sur la même membrane, une étape de lavage au TBS-Tween pendant 5 minutes doit être réalisée avant de laver la membrane durant 5 minutes au Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific - USA). Le stripper permet d'enlever les anticorps s'étant liés à nos protéines, sans pour autant détacher les protéines et ainsi éliminer le signal existant. Une autre étape de lavage au TBS-Tween est enfin réalisée pendant 20 minutes avant de recommencer le protocole à partir de l'étape de blocage.

### Quantification du signal

La quantification du signal est réalisée par densitométrie grâce au programme ImageJ. Les valeurs obtenues sont normalisées à l'aide du signal de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

#### 5.11. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

Afin d'évaluer les niveaux de transcription de plusieurs gènes d'intérêt (voir Table 4) dans le tissu rénal, une PCR (polymerase chain reaction) quantitative en temps réel ou RT-qPCR a été réalisée.

Il est à noter que toutes les étapes sont réalisées en conditions RNase free afin d'éviter toute dégradation de l'ARN contenu dans les échantillons.

### Extraction des acides nucléiques

Les tissus rénaux ont été homogénéisés avec 1 mL de Trizol (TRI reagent, Sigma – USA) à l'aide d'un potter électrique (Bioblock Scientific – France). Après une incubation à température ambiante durant 5 minutes, 200 µL de chloroforme (VWR – France) sont ajoutés aux homogénats pendant 3 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12000 rpm à 4°C durant 20 minutes afin de récupérer la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Après l'ajout de 500 µL d'alcool isopropyl (Merck – Allemagne) à la phase aqueuse précédemment prélevée, les échantillons sont homogénéisés par retournement et incubés à température ambiante durant 10 minutes et centrifugés à 12000 rpm à 4°C durant 15 minutes. Les acides nucléiques se trouvant alors dans le culot sont lavés dans 1 mL d'éthanol 75 % (Univar Blandain – Belgique), avant d'être une dernière fois centrifugés à 7500 rpm à 4°C durant 5 minutes. Enfin, le surnageant est éliminé, ne laissant que les acides nucléiques dans le culot pour la prochaine étape de traitement à la DNase.



### Traitement à la DNase

Un traitement à la DNase (Promega – Belgique) a été effectué pour dégrader les molécules d'ADN présentes dans les échantillons et ne récupérer que l'ARN total. Pour ce faire, chaque échantillon a été incubé à 37°C durant 30 minutes dans un mix de solution composé d'1 µL de DNase, 1 µL de tampon DNase (Promega – Belgique) et 8 µL d'eau RNase free (Promega – Belgique). Cette réaction est arrêtée par l'ajout de 1 µL de DNase stop (Promega – Belgique) et en laissant à nouveau incubé à 37°C durant 30 minutes. Les échantillons sont enfin chauffés durant 10 minutes à 65°C avant d'être dilués 10 fois dans de l'eau RNase free. Pour finir, une mesure de la concentration en ARN total des échantillons est réalisée à l'aide d'un NanoDrop (NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific – USA) afin de connaître le volume à prélever pour obtenir 2 µg d'ARN nécessaires à l'étape suivante.

### Transcription inverse (RT-PCR)

Une étape de transcription inverse ou RT-PCR a été effectuée, afin de produire de l'ADN complémentaire à partir des 2 µg d'ARN précédemment isolés des échantillons. Le mélange pour effectuer la RT-PCR, composé de 6 µL d'ARN, de 7 µL d'eau RNase free, d'1 µL de dNTP, de 4 µL de tampon MLV (Murine Leukemia Virus), d'1 µL d'enzyme MLV et 1 µL de random hexamer 1/10, est vortexé puis centrifugé pendant quelques secondes avant d'incuber à 25°C durant 10 minutes dans la machine PCR. Enfin, la transcription inverse est effectuée selon le cycle suivant : 50 minutes à 42°C, 15 minutes à 70°C (BioRad, T100™ Thermo Cycle – USA). Les échantillons d'ADN complémentaire ainsi obtenus sont ensuite dilués avant d'être stockés prêts à l'emploi à -80°C.

### Real-Time PCR (RT-qPCR)

Enfin, l'étape à proprement parlé de RT-qPCR a été réalisée. Pour ce faire, un mix de 15 µL contenant des primers sens et antisens (Table 4), du SybrGreen (Roche diagnostics – Belgique) et 5 µL d'ADN complémentaire, a été déposé sur une plaque multipuits. Le SyberGreen est un agent intercalant fluorescent qui se lie à l'ADN double brin, permettant de déterminer la quantité d'ADN présent dans le puits. Les primers quant à eux permettent de cibler la séquence d'ADN codant pour le gène d'intérêt à amplifier.

La plaque (Eurogentec – Belgique) contenant notre mélange est ensuite centrifugée pendant 3 minutes à 1200 rpm et finalement introduite dans la machine de PCR quantitative (Light cycler, Roche diagnostics – Belgique) utilisant le logiciel LightCycler 96. La quantité d'ARNm présente au départ dans notre échantillon est déterminée à partir du nombre de cycles d'amplification nécessaires pour détecter l'ADN complémentaire ainsi formé.

Il est à noter que le gène de « housekeeping » utilisé comme contrôle dans cette expérience est le gène d'ARN ribosomal 18S.

|                                  | Séquence du primer sens (5'-3') | Séquence du primer anti-sens (5'-3') |
|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| Chemerin (Eurogentec – Belgique) | GGA GTG CAC AAT CAA ACC AA      | TTT TAC CCT TGG GGT CCA TT           |
| CMKLR1 (Eurogentec – Belgique)   | GCG AGT TCT CAA ACC CTG AA      | TGC GCG TGA CTG GAA ATA C            |



|  |                                      |                                      |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| GPR1 (Eurogentec – Belgique)                   | AAA AGC TGT TTG AGG CTA<br>GAA AGG   | AGG AAA TCT GTT AAT GTT<br>CTG TGC G |
| CCLR2 (Eurogentec – Belgique)                  | TCA AAC GAC GCT GTT TTG<br>TC        | GGG CCA CTG TGT AGT TAT<br>CCA       |
| Periostin (Eurogentec – Belgique)              | TCG TGG AAC CAA AAA TTA<br>AAG TC    | CTT CGT CAT TGC AGG TCC<br>TT        |
| Leptin receptor (Eurogentec – Belgique)        | GTT CCA AAC CCC AAG AAT<br>TG        | GAC TTC AAA GAG TGT CCG<br>TTC TC    |
| Adiponectin receptor 1 (Eurogentec – Belgique) | TTT GCC ACT CCC AAG CAC              | ACA CCA CTC AAG CCA AGT<br>CC        |
| Adiponectin receptor 2 (Eurogentec – Belgique) | AGG GCA CCA ACT TGA TGA<br>TAC AAG   | CCC ATA AAC CCT TCA TCT<br>TCC TG    |
| IL-1 $\beta$ (Eurogentec – Belgique)           | AGT TGA CGG ACC CCA AAA<br>G         | AGC TGG ATG CTC TCA TCA<br>GG        |
| IL-6 (Eurogentec – Belgique)                   | GCT ACC AAA CTG GAT ATA<br>ATC AGG A | CCA GGT AGC TAT GGT ACT<br>CCA GAA   |
| MCP-1 (Eurogentec – Belgique)                  | CTT CTG GGC CTG CTG TTC A            | CCA GCC TAC TCA TTG GCA<br>TCA       |
| TNF- $\alpha$ (Eurogentec – Belgique)          | TAC TGA ACT TCG GGG TGA<br>TTG GTC C | CAG CCT TGT CCC TTG AAG<br>AGA ACC   |
| TGF- $\beta$ (Eurogentec – Belgique)           | CCT GGA AAG GGC TCA ACA<br>C         | CAG TTC TTC TCT GTG GAG<br>CTG A     |
| Collagène de type I (Eurogentec – Belgique)    | GCA GGT TCA CCT ACT CTG<br>TCC T     | CTT GCC CCA TTC ATT TGT<br>CT        |
| Collagène de type III (Eurogentec – Belgique)  | TCC CCT GGA ATC TGT GAA<br>TC        | TGA GTC GAA TTG GGG AGA<br>AT        |
| NOX1 (Eurogentec – Belgique)                   | TCC TTC GCT TTT ATC GCT<br>CC        | TCG CTT CCT CAT CTG CAA<br>TTC       |
| NOX2 (Eurogentec – Belgique)                   | TCC TAT GTT CCT GTA CCT<br>TTG TG    | GTC CCA CCT CCA TCT TGA<br>ATC       |
| NOX4 (Eurogentec – Belgique)                   | TCC AAG CTC ATT TCC CAC<br>AG        | CGG AGT TCC ATT ACA TCA<br>GAG G     |
| 18S (Eurogentec – Belgique)                    | CGC CGC TAG AGG TGA AAT<br>TCT       | CGA ACC TCC GAC TTT CGT<br>TCT       |

**Table 4.** Primers utilisés pour réaliser la RT-qPCR.

## 6. Statistiques et calculs

La détermination de la signification statistique entre les groupes de données a été évaluée par une « two-way analysis of variance » (ANOVA II) ou une « three-way analysis of variance » (ANOVA III) suivie d'un test de Holm-Sidak. Les données sont exprimées sous forme de valeurs moyennes  $\pm$  SEM et le niveau de signification statistique a été défini comme  $p < 0,05$ . L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel SigmaPlot 11.0.

Le bilan hydrique (%) a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Bilan Hydrique} = \frac{\text{Volume Urinaire (mL/24h)}}{\text{Prise d'eau (mL/24h)}} \times 100$$

L'augmentation relative du poids corporel (%) a été calculée par la formule suivante :

$$\text{Gain de poids} = \frac{(\text{Poids Semaine } n \text{ (g)} - \text{Poids Semaine 0 (g)})}{\text{Poids Semaine 0 (g)}} \times 100$$

$n = 0; 8; 12; 16$

Le débit de filtration glomérulaire (mL/24h) a été calculé par la formule suivante :

$$\text{DFG} = \frac{(\text{Créatinine urinaire (mg/dL)} \times \text{Diurèse (mL/24h)})}{\text{Créatinine plasmatique (mg/dL)}}$$

# Résultats

La première partie des résultats vise à caractériser le modèle murin d'insuffisance rénale induite par un régime alimentaire riche en graisse. Pour ce faire, les différents groupes de souris décrits dans la section matériels et méthodes, à savoir LFD (régime pauvre en graisse), HFD (régime riche en graisse) et HFDF (régime riche en graisse où 30% de fructose a été ajouté à l'eau de boisson), seront comparés après 16 semaines de régime. Nos résultats traitant également de l'influence du genre, une comparaison entre les individus mâles et femelles suivant le même régime sera effectuée pour tous les résultats obtenus. La seconde partie se concentre sur l'évaluation de l'effet du régime sur l'expression des adipokines et plus particulièrement celle de la chémérine, la leptine et l'adiponectine. Les trois dernières parties de ce travail traitent, quant à elles, de l'inflammation, du stress oxydatif et de la fibrose induits par un régime riche en graisse.

### 1. Caractérisation du modèle murin C57Bl/6 d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisse

L'objectif de cette première partie de l'étude est de caractériser le modèle expérimental, en évaluant plusieurs paramètres métaboliques tels que la variation de poids corporel, l'hypertrophie des organes et le métabolisme du glucose chez les souris des différents groupes. Ensuite, une analyse de la fonction et de la structure rénale a également été effectuée.

#### 1.1. Paramètres métaboliques

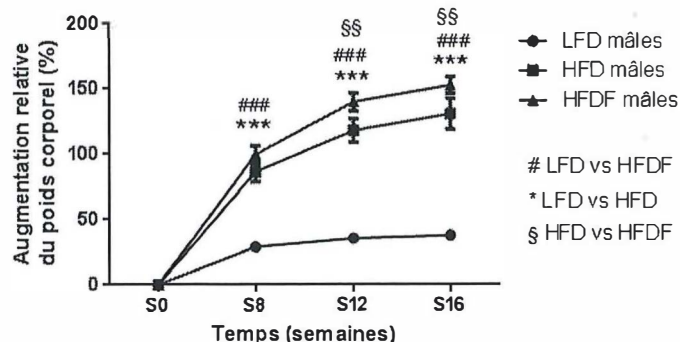
##### Augmentation relative du poids corporel

Pour déterminer si un régime riche en graisse induit le développement d'une surcharge pondérale chez la souris C57Bl/6, et si le genre influence cette évolution, le poids corporel de chaque souris a été mesuré à plusieurs reprises tout au long du protocole expérimental, soit aux semaines 0, 8, 12 et 16. Au début du protocole expérimental, les souris de tous les groupes confondus présentaient un poids corporel similaire (NS), soit de  $16,8\text{g} \pm 0,4\text{g}$ . La Figure 18 représente l'augmentation relative du poids corporel (PC) des souris, déterminée d'après la formule détaillée dans la rubrique matériels et méthodes. L'augmentation relative du PC permet de visualiser l'évolution de la charge pondérale rapportée au poids corporel des souris mesuré au début du protocole expérimental, soit à la semaine 0. Une augmentation du PC des souris mâles et femelles LFD est observée tout au long du protocole. Cette augmentation atteint environ 38% pour les souris mâles et 47% pour les souris femelles à la fin du protocole (soit une masse moyenne de  $26,5\text{g} \pm 0,8\text{g}$  pour les mâles et  $20,9\text{g} \pm 0,6\text{g}$  pour les femelles LFD à la 16<sup>ème</sup> semaine), mais reste néanmoins cohérente avec un accroissement naturel du poids corporel lié à l'âge. En revanche, l'augmentation du PC des souris mâles et femelles HFD et HFDF présente une évolution différente : en effet, l'augmentation relative du PC est significativement plus élevée dans les groupes HFD et HFDF par rapport au groupe LFD à partir de la huitième semaine (mâles - $p < 0,001$ - et femelles - $p < 0,05$ -, respectivement) et ce jusqu'à la fin du protocole ( $p < 0,001$ ). Cette augmentation atteint, à la fin du protocole, environ 122% et 153% pour les souris mâles HFD et HFDF, et 125% et 135% pour les souris femelles HFD et HFDF, respectivement (soit une masse moyenne de  $42,1\text{g} \pm 2,3\text{g}$  pour les mâles et  $33,6\text{g} \pm 1,5\text{g}$  pour les femelles HFD et une masse moyenne de  $46,5\text{g} \pm 1,4\text{g}$  pour les mâles et  $35,2\text{g} \pm 1,1\text{g}$  pour les femelles HFDF à la 16<sup>ème</sup> semaine). Une différence significative entre les groupes de souris mâles HFD et HFDF est également démontrée à la douzième et seizième semaine ( $p < 0,01$ ). Néanmoins, aucune différence entre les mâles et les femelles suivant le même régime n'est constatée. Ces résultats sont donc cohérents avec une augmentation relative du PC chez les souris HFD et HFDF, aussi bien mâles que femelles, au cours du protocole expérimental.



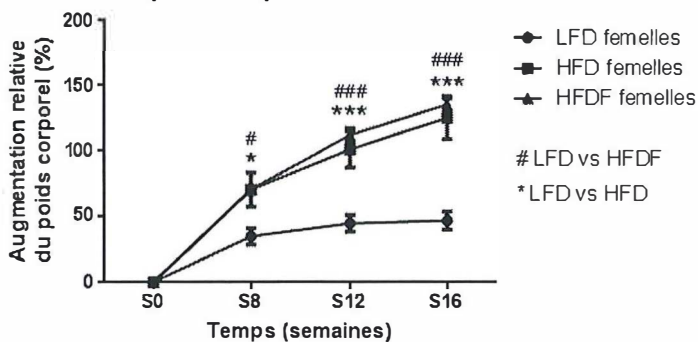
A

## Augmentation relative du poids corporel des mâles



B

## Augmentation relative du poids corporel des femelles



**Figure 18.** Évolution temporelle de l'augmentation relative du poids corporel (%) des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) A) mâles et B) femelles. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. §§p<0,01 HFD vs HFDF ; \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 LFD vs HFD ; ###p<0,001 LFD vs HFDF.

### Variation du poids des organes et des données métaboliques

Afin d'étudier le développement d'une infiltration ectopique de graisse et de déterminer le degré d'hypertrophie des organes dans les différents groupes de souris, mais aussi l'influence du genre sur ce paramètre, les reins, le foie et le cœur ont été pesés. Le poids de ces organes a été rapporté à la longueur du tibia afin de normaliser les données (Table 5). Les poids des reins et du foie des groupes de souris mâles HFD et HFDF sont significativement plus élevés par rapport à ceux mesurés dans le groupe de souris mâles LFD (reins :  $p<0,01$  et foie :  $p<0,001$ , respectivement). Le poids du foie des souris mâles HFDF est également significativement plus élevé que celui mesuré chez les souris mâles HFD ( $p<0,05$ ). Les différences observées entre les groupes de femelles présentent une tendance similaire à celle caractérisant l'évolution du poids du foie chez les mâles. En effet, une augmentation significative du poids du foie est observée dans les groupes de souris femelles HFD et HFDF par rapport au groupe de souris femelles LFD (HFD :  $p<0,05$  et HFDF :  $p<0,001$ , respectivement), mais aussi pour le groupe de souris femelles HFDF par rapport à celui des souris femelles HFD ( $p<0,05$ ). Par contre, aucune différence significative entre les femelles n'est observée concernant le poids des reins. Le poids du cœur, quant à lui, est significativement plus élevé chez les souris mâles HFDF que chez les souris mâles LFD ( $p<0,05$ ). Le groupe de souris mâles HFD suit la même tendance que le groupe de souris mâles HFDF, sans pour autant rejoindre un seuil statistique. En revanche, le poids du cœur des souris femelles ne varie pas significativement selon les régimes. Concernant la différence liée au genre, le poids des reins est significativement inférieur dans chaque groupe de souris femelles par rapport aux groupes de souris mâles (LFD :  $p<0,05$  ; HFD et HFDF :  $p<0,001$ ). Le poids du foie et du cœur, quant à eux, sont inférieurs chez les femelles HFD et HFDF par rapport aux mâles HFD et HFDF, respectivement (foie :  $p<0,01$  et cœur :  $p<0,05$ ).

À la semaine 16, la quantité de nourriture absorbée par les souris mâles du groupe HFDF est significativement réduite par rapport à celle mesurée dans le groupe de souris mâles LFD ( $p<0,05$ ). Il en est de même pour les groupes de souris femelles HFD et HFDF par rapport au groupe de souris femelles LFD ( $p<0,05$ ). De plus, les souris femelles HFDF absorbent significativement plus de nourriture que les mâles HFDF ( $p<0,05$ ). En ce qui concerne la quantité de nourriture absorbée, aucune différence atteignant un seuil de signification n'a été observée entre les autres groupes. La balance hydrique ne varie pas de manière significative entre les souris du même sexe suivant un régime différent. Néanmoins, deux tendances opposées, ne rejoignant pas un seuil significatif, peuvent être observées. En

effet, la balance hydrique des souris mâles HFD et HFDF a tendance à être plus élevée que celle calculée chez les souris mâles LFD. Au contraire, les souris femelles HFD et HFDF ont tendance à avoir une résultante de balance hydrique moindre que les souris femelles LFD. De ce fait, il apparaît clairement que les souris femelles HFD et HFDF possèdent un bilan hydrique significativement moins élevé que leurs homologues mâles ( $p < 0,05$ ) (Table 5).

Dans l'optique de déterminer si un régime riche en graisse, et d'autant plus si l'eau de boisson contient du fructose, est capable d'induire une résistance à l'insuline, les concentrations en insuline plasmatique et la glycémie, après un jeûne de 6 heures, ont été mesurées à la fin du protocole expérimental. De plus, l'influence du genre sur ce paramètre a également été évaluée. Ces données relatives au métabolisme du glucose sont également présentées dans la Table 5. En ce qui concerne l'insulinémie, aucune différence significative n'est constatée entre les différents régimes, de même qu'entre les sexes. Toutefois, une même tendance pour les mâles et les femelles est observée ; les souris consommant un régime riche en graisse (HFD et HFDF) ont tendance à présenter une insulinémie plus élevée que celle mesurée chez les souris nourries avec un régime pauvre en graisse. Cependant, les données relatives à la glycémie mettent en évidence des valeurs de glycémie significativement plus élevées chez les souris mâles HFD et HFDF par rapport aux souris mâles LFD ( $p < 0,001$ ). Une augmentation similaire est observée dans le groupe de souris femelles HFDF en comparaison au groupe de souris femelles LFD ( $p < 0,001$ ), alors qu'aucune différence significative n'est rapportée pour le groupe de souris femelles HFD. De plus, la glycémie à jeun des souris femelles est significativement inférieure à celle des mâles nourris avec le même régime, pour les groupes HFD ( $p < 0,01$ ) et HFDF ( $p < 0,05$ ), alors qu'aucune différence n'est observée entre les groupes LFD.

## Résultats

|   | LFD<br>mâles | HFD<br>mâles        | HFDF<br>mâles       | LFD femelles   | HFD femelles       | HFDF<br>femelles       |
|---|--------------|---------------------|---------------------|----------------|--------------------|------------------------|
| Poids des reins/Longueur du tibia (mg/mm) | 7,4 ± 0,3    | 8,7 ± 0,3<br>**     | 8,8 ± 0,5<br>##     | 6,2 ± 0,2<br>° | 7,1 ± 0,2<br>°°°   | 7,2 ± 0,1<br>°°°       |
| Poids du foie/Longueur du tibia (mg/mm)   | 50,3 ± 5,1   | 73,8 ± 3,9<br>***   | 90,2 ± 5,6<br>### § | 43,5 ± 3,3     | 55,9 ± 4,3<br>* °° | 71,1 ± 2,7<br>### § °° |
| Poids du cœur/Longueur du tibia (mg/mm)   | 6,8 ± 0,3    | 7,9 ± 0,4           | 8,1 ± 0,3<br>#      | 6,4 ± 0,2      | 6,7 ± 0,3<br>°     | 7,1 ± 0,3<br>°         |
| Quantité de nourriture absorbée (g/24h)   | 1,6 ± 0,33   | 0,9 ± 0,19          | 0,6 ± 0,15<br>#     | 2,1 ± 0,38     | 1,1 ± 0,04<br>*    | 1,3 ± 0,12<br># °      |
| Balance hydrique (%)                      | 15,8 ± 4,0   | 22,0 ± 4,2          | 20,0 ± 3,9          | 17,4 ± 6,6     | 11,2 ± 2,6<br>°    | 6,9 ± 1,9<br>°         |
| Insuline plasmatique (ng/mL)              | 0,2 ± 0,02   | 0,4 ± 0,06          | 0,4 ± 0,03          | 0,2 ± 0,03     | 0,5 ± 0,12         | 0,5 ± 0,09             |
| Glycémie (mg/dL)                          | 128,2 ± 10,8 | 196,0 ± 16,7<br>*** | 212,7 ± 13,9<br>### | 102,0 ± 2,7    | 133,8 ± 12,2<br>°° | 174,4 ± 13,0<br>### °  |

**Table 5.** Effet du régime et du genre sur les paramètres métaboliques des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. §p<0,05 HFD vs HFDF de même sexe ; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 LFD vs HFD de même sexe ; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 LFD vs HFDF de même sexe ; °p<0,05, °°p<0,01, °°°p<0,001 mâles vs femelles suivant le même régime.

### 1.2. Structure et fonction rénale

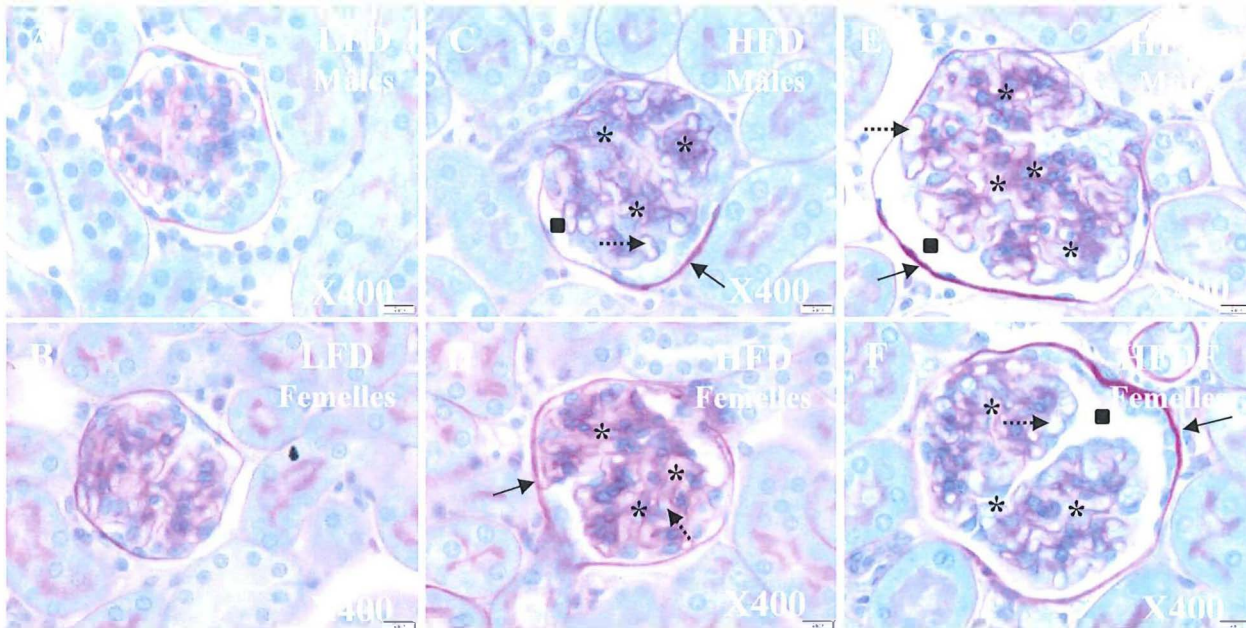
Pour procéder à l'examen histologique, une coloration au PAS, permettant de visualiser les éventuels dommages tissulaires liés à un excès de graisse, a été effectuée sur des coupes de tissu rénal prélevé à la fin du protocole.

#### Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'histologie glomérulaire

Dans le but de quantifier les atteintes glomérulaires et ainsi évaluer l'impact d'un régime riche en graisse ainsi que l'influence potentielle du genre, une analyse semi-quantitative a été réalisée sur des photographies de glomérules des souris appartenant aux différents groupes expérimentaux (mâles et femelles LFD; mâles et femelles HFDF; mâles et femelles HFDF). Les groupes de souris mâles et femelles LFD n'ont montré aucune altération morphologique au niveau des glomérules (Figures 19A-B). En revanche, chez les souris mâles et femelles HFD et HFDF, une glomérulosclérose ainsi qu'une dilatation des capillaires et de la capsule de Bowman sont observés (Figures 19C-F). Les astérisques montrent une expansion de la matrice mésangiale des souris appartenant aux groupes HFD et HFDF. De plus, la surface des glomérules augmente avec un régime riche en graisse en comparaison avec un régime LFD (mâles HFD et femelles HFDF p<0,01 ; mâles HFDF et femelles HFD p<0,001), comme illustré à la Figure 20A. Cette augmentation est accompagnée d'une extension de la surface occupée par la matrice mésangiale (p<0,01) et des noyaux glomérulaires (p<0,05) pour les groupes HFD et HFDF par rapport au groupe LFD, aussi bien chez les souris mâles que femelles (Figures 20B et 20D). La surface

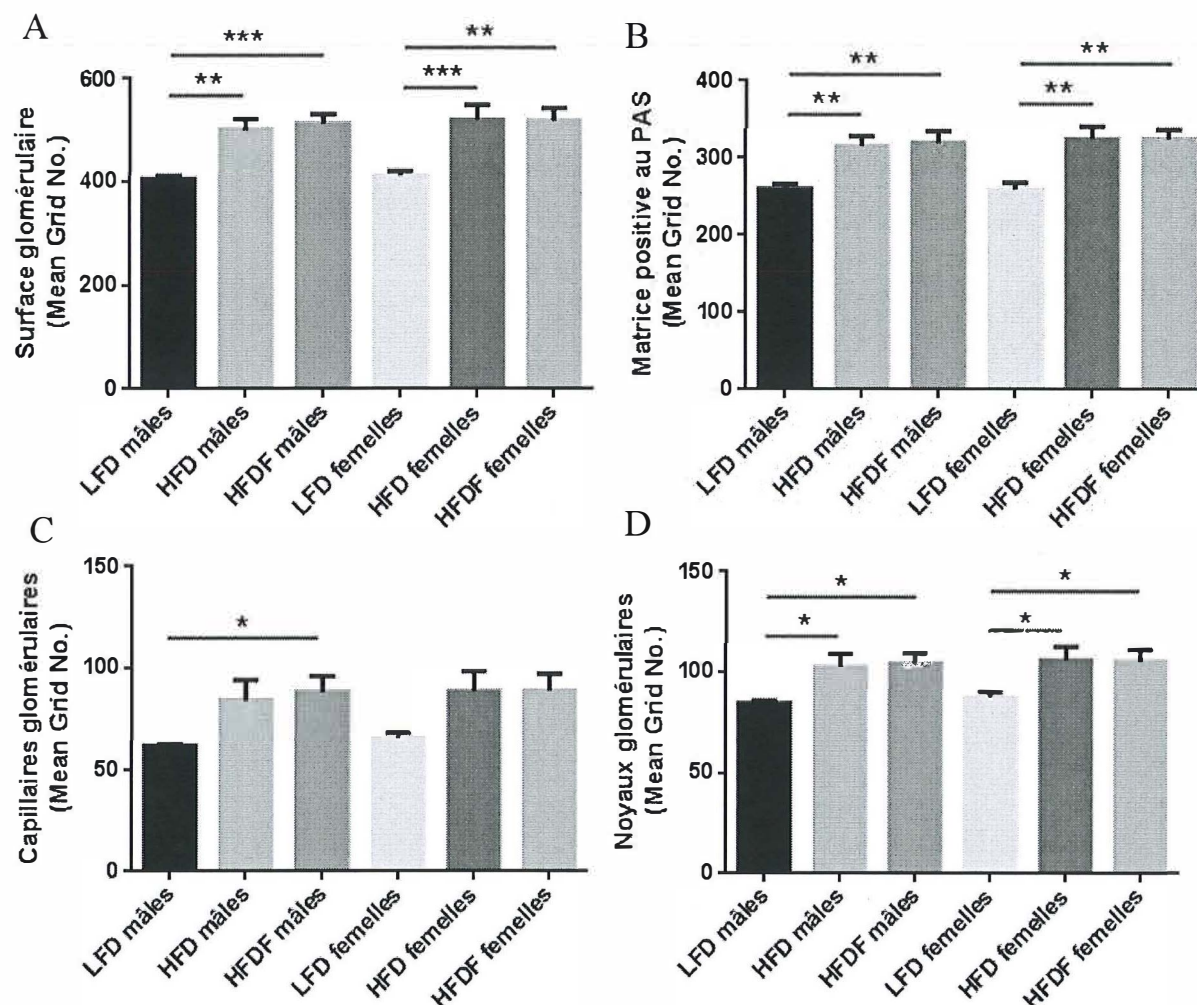


occupée par les capillaires glomérulaires est également accrue même si cette tendance atteint un seuil statistique uniquement pour les mâles HFDF en comparaison au mâles LFD ( $p < 0,05$ ) (Figure 20C). Aucune différence entre souris mâles et femelles concernant ces paramètres n'est observée.



**Figure 19.** Impact d'un régime riche en graisse et du genre sur l'histologie glomérulaire. Photographies représentatives d'une coloration au PAS du tissu rénal des souris des groupes A) LFD mâles ( $n = 6$ ) ; B) LFD femelles ( $n = 6$ ) ; C) HFD mâles ( $n = 6$ ) ; D) HFD femelles ( $n = 6$ ) ; E) HFDF mâles ( $n = 7$ ) ; F) HFDF femelles ( $n = 7$ ) à la semaine 16 ; Grossissement 400x. Astérisques (\*) montrent une expansion de la matrice mésangiale chez les souris mâles et femelles des groupes HFD et HFDF ; les flèches pleines (→) montrent une glomérulosclérose chez les souris mâles et femelles des groupes HFD et HFDF ; les flèches en pointillés (···→) montrent une dilatation des capillaires et les carrés (■) montrent une dilatation de la capsule de Bowman chez les souris mâles et femelles des groupes HFD et HFDF.

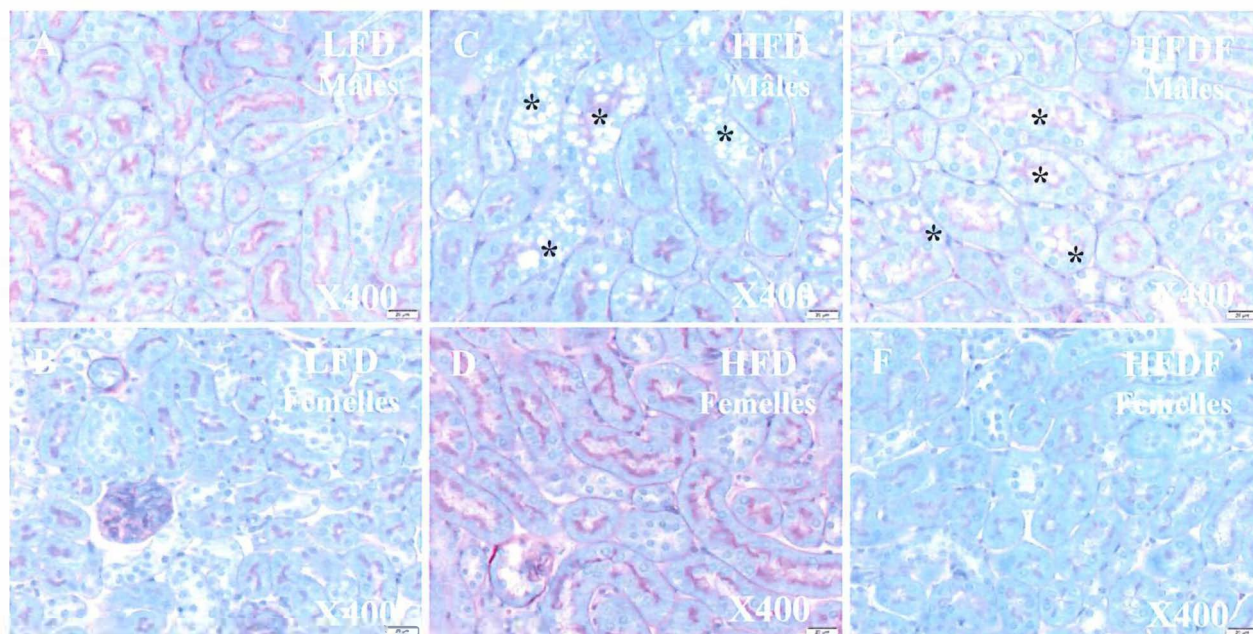




**Figure 20.** Impact d'un régime riche en graisse et du genre sur l'histologie glomérulaire. Analyse semi-quantitative de la surface glomérulaire des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. A) Analyse de la surface glomérulaire. Analyse de la surface occupée par B) la matrice mésangiale, C) les capillaires glomérulaires et D) les noyaux glomérulaires. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  entre les groupes du même sexe.

### Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'histologie tubulaire

Les souris mâles et femelles du groupe LFD n'ont montré aucune altération morphologique au niveau des tubules rénaux (Figures 21A-B). En revanche, les souris mâles des groupes HFD et HFDF présentent un grand nombre de cellules tubulaires contenant des vacuoles lipidiques (Figures 21C et 21E). Ces vacuoles sont principalement situées dans les cellules des segments S1 et S2 du tubule proximal, se trouvant dans le cortex rénal. Le segment S3 des tubules proximaux, principalement localisé dans l'OSOM et caractérisé par un épaississement de la bordure en brosse ne présente pas de vacuolisation. De plus, les femelles HFD et HFDF ne présentent pas de vacuoles au sein de leurs cellules tubulaires (Figures 21D et 21F).



**Figure 21.** Impact d'un régime riche en graisse et du genre sur l'histologie tubulaire. Photographies représentatives d'une coloration au PAS du tissu rénal des souris des groupes A) LFD mâles (n = 6) ; B) LFD femelles (n = 6) ; C) HFD mâles (n = 6) ; D) HFD femelles (n = 6) ; E) HFDF mâles (n = 7) ; F) HFDF femelles (n = 7) à la semaine 16 ; Grossissement 400x. Astérisques (\*) montrent la vacuolisation des tubules chez les souris mâles des groupes HFD et HFDF.

## Évaluation de l'effet du régime et du genre sur les paramètres urinaires

Comme décrit dans la section Matériels et Méthodes, la diurèse et l'osmolarité, qui reflètent la fonction rénale, ont été évaluées à la semaine 16. L'analyse de ces résultats ne révèle aucune différence significative entre les différents groupes de souris mâles. Il en est de même pour les souris femelles, et ce malgré une légère diminution de la diurèse et une tendance à l'augmentation de l'osmolarité avec les régimes riches en graisses (Table 6). On peut toutefois noter une augmentation significative de l'osmolarité chez les souris femelles des groupes HFD et HFDF par rapport aux mâles suivant le même régime ( $p < 0,01$ ). L'analyse statistique du DFG ne montre aucune différence significative entre les différentes conditions. Néanmoins, les mâles HFD et HFDF semblent présenter une élévation du DFG, sans toutefois rejoindre un seuil statistique (Table 6).

Afin d'identifier les signes d'une insuffisance rénale, la protéinurie et l'urémie (Blood Urea Nitrogen ; BUN) ont été mesurées. En ce qui concerne la protéinurie, aucune différence statistique n'est observée entre les groupes de souris mâles malgré une tendance à l'augmentation de ce paramètre chez les souris obèses (groupes HFD et HFDF). De même, aucune différence n'est relevée entre les groupes de souris femelles. Toutefois, une différence nette entre les mâles et les femelles apparaît pour ce paramètre. En effet, les femelles HFD et HFDF présentent une protéinurie significativement inférieure à celle des mâles HFD et HFDF (HFD :  $p < 0,05$  et HFDF :  $p < 0,001$ , respectivement). La Table 6 montre également une diminution significative du BUN dans les groupes de souris mâles HFD et HFDF par rapport au groupe de souris mâles LFD ( $p < 0,001$ ). Il en est de même pour les femelles HFD par rapport aux femelles LFD ( $p < 0,001$ ). Le BUN est également inférieur dans le groupe de souris femelles LFD par rapport au groupe de souris mâles LFD ( $p < 0,01$ ). Pour terminer, l'albuminurie, traduisant une altération de la fonction rénale, a été mesurée. Cette valeur est normalisée sur base de la concentration urinaire en créatinine. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence concernant les taux d'albuminurie entre les animaux suivant différents régimes et ni entre les animaux de sexe différent, comme illustré Table 6.



## Résultats

|                                | LFD mâles     | HFD mâles        | HFDF mâles       | LFD femelles            | HFD femelles               | HFDF femelles                |
|--------------------------------|---------------|------------------|------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Diurèse (mL/24h)               | 0,8 ± 0,3     | 0,7 ± 0,1        | 1,0 ± 0,2        | 1,0 ± 0,5               | 0,4 ± 0,1                  | 0,3 ± 0,1                    |
| Osmolarité (mOsm/Kg)           | 2418 ± 329,0  | 2355 ± 339,3     | 1799 ± 367,5     | 2970 ± 314,1            | 4188 ± 711,9 <sub>oo</sub> | 3837 ± 439,7 <sub>oo</sub>   |
| DFG (mL/24h)                   | 509,6 ± 165,6 | 996,9 ± 184,8    | 720,0 ± 108,5    | 587,9 ± 169,9           | 511,3 ± 35,58              | 517,0 ± 81,47                |
| Protéinurie (µg/24h)           | 1824 ± 342,9  | 2804 ± 655,3     | 3472 ± 661,4     | 673,5 ± 447,4           | 955,6 ± 430,1 <sub>o</sub> | 902,4 ± 172,0 <sub>ooo</sub> |
| Urée plasmatique / BUN (mg/dL) | 6,3 ± 0,2     | 4,4 ± 0,3<br>*** | 3,9 ± 0,2<br>### | 4,9 ± 0,5 <sub>oo</sub> | 3,8 ± 0,2<br>***           | 4,1 ± 0,3                    |
| Albuminurie (mg/mg cre)        | 0,3 ± 0,06    | 0,4 ± 0,03       | 0,4 ± 0,08       | 0,3 ± 0,07              | 0,3 ± 0,05                 | 0,2 ± 0,02                   |

**Table 6.** Effets d'un régime riche en graisse et du genre sur les paramètres urinaires des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \*\*\*p<0,001 LFD vs HFD de même sexe ; ###p<0,001 LFD vs HFDF de même sexe ; °p<0,05, °°p<0,01, °°°p<0,001 mâles vs femelles suivant le même régime.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette première partie ont permis de caractériser et valider ce modèle de néphropathie induite par un régime riche en graisse. En effet, nos résultats, même s'ils n'atteignent pas toujours un seuil statistique, restent cohérents avec le développement de l'obésité et une altération de la fonction rénale induite par le régime riche en graisse. Le fructose ajouté dans l'eau de boisson, quant à lui, ne semble pas avoir d'impact sur les paramètres métaboliques et rénaux, à l'exception de l'augmentation du PC et du poids des organes. De plus, le genre semble influencer autant la fonction rénale que les paramètres métabolique dans ce modèle et ce, d'autant plus chez les souris nourries avec un régime riche en graisse. Effectivement, les mâles apparaissent être plus affectés par le régime alimentaire d'un point de vue métabolique et urinaire que leurs homologues femelles.

## 2. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur les adipokines

Comme démontré précédemment, un régime riche en graisse possède une influence sur le poids corporel, ainsi que sur certains marqueurs métaboliques de base. Cette deuxième partie traite des effets potentiels du régime et du genre sur la production et la sécrétion des adipokines d'un point de vue rénal, mais aussi plus systémique.

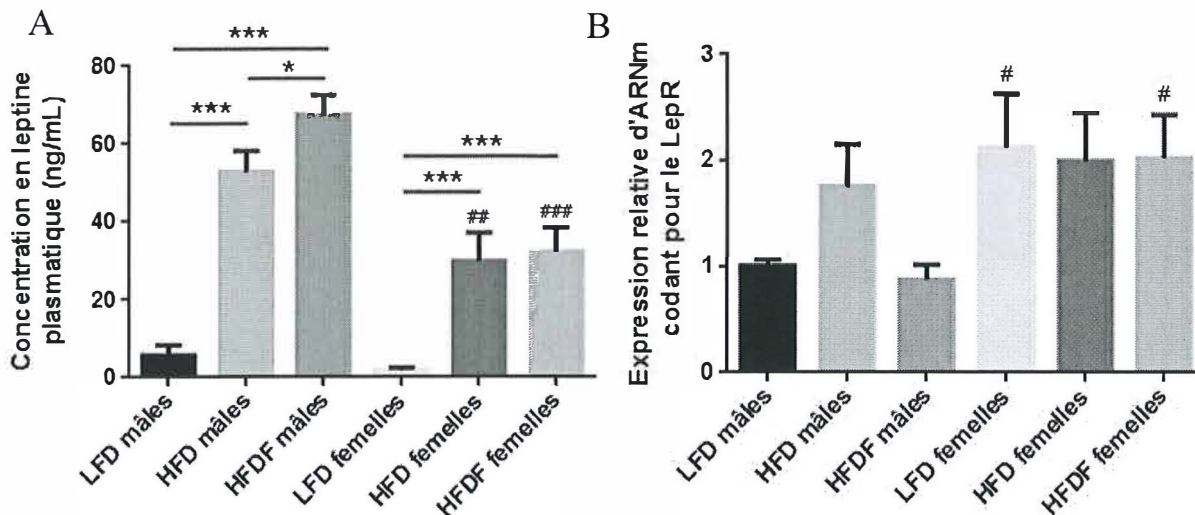
### 2.1. Leptine

La première adipokine analysée dans le cadre de cette étude est la leptine. Pour ce faire, sa concentration plasmatique a été mesurée afin de déterminer l'impact des régimes et l'influence du genre sur cette dernière. Comme le montre la Figure 22A, les concentrations plasmatiques en leptine à la semaine 16 des groupes de souris mâles HFD et HFDF sont statistiquement plus élevées que celles du groupe de souris mâles LFD (p<0,001). Une différence similaire peut être observée pour les groupes de souris femelles (p<0,001). En outre, l'augmentation mise en évidence chez les souris mâles HFDF est significativement supérieure à celle mesurée chez les souris mâles HFD (p<0,05). Une différence entre les



mâles et les femelles peut également être soulignée : en effet, les femelles HFD et HFDF présentent une leptinémie nettement inférieure à celle des mâles suivant les mêmes régimes (HFD :  $p < 0,01$  et HFDF :  $p < 0,001$ , respectivement).

La Figure 22B illustre l'expression relative d'ARNm codant pour le *récepteur de la leptine* (*LepR*) dans le tissu rénal. Malgré une tendance à la hausse de l'expression relative d'ARNm codant pour *ce récepteur* avec un régime HFD chez les mâles, aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre les différents groupes de souris mâles. Aucune différence n'est observée entre les différents groupes de souris femelles. Toutefois, une différence des niveaux d'expression relatifs d'ARNm est clairement visible entre les groupes de souris mâles et femelles suivant les régimes LFD et HFDF ( $p < 0,05$ ).

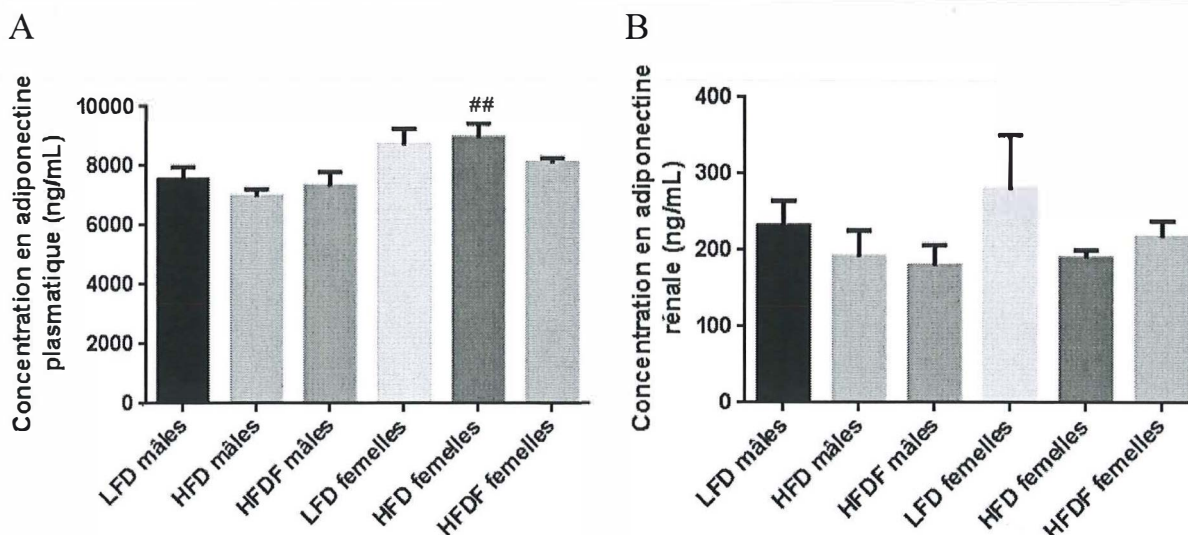


**Figure 22.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur A) les concentrations plasmatiques en la leptine et B) l'expression relative ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) d'ARNm codant pour le *récepteur de la leptine* (*LepR*) dans le tissu rénal des souris des groupes LFD ( $n = 6$ ), HFD ( $n = 6$ ) et HFDF ( $n = 7$ ) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  entre les groupes du même sexe ; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

### 2.2. Adiponectine

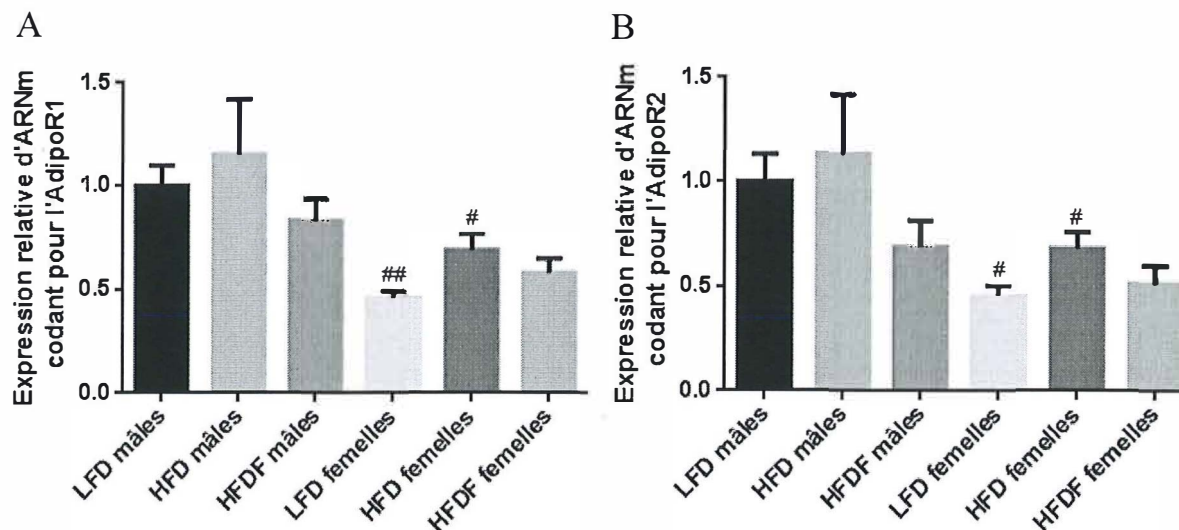
Afin d'évaluer l'impact du régime et du genre sur la sécrétion de l'adiponectine, ainsi que sur l'expression de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), les concentrations plasmatique et rénale en adiponectine ont été évaluées, avant de déterminer les niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour *ses deux récepteurs* par une RT-qPCR.

Les concentrations en adiponectine plasmatique et rénale n'ont révélé aucune différence significative entre les différents régimes, parmi les mâles et les femelles, à la semaine 16 (Figures 23A-B). Néanmoins, une augmentation de la concentration en adiponectine plasmatique émerge chez les souris femelles HFD en comparaison avec les mâles HFD ( $p < 0,01$ ), comme le montre la Figure 23A.



**Figure 23.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur A) les concentrations plasmatiques et B) rénales en l'adiponectine des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. ##p<0,01 entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

Les niveaux d'expression relative d'ARNm codant pour les *récepteurs de l'adiponectine*, quant à eux, montrent une différence significative uniquement entre les mâles et les femelles suivant les régimes LFD et HFD. En effet, une diminution nette de l'expression de ces deux récepteurs chez ces femelles est clairement observée. Il est à noter qu'*AdipoR1* et *AdipoR2* suivent un profil d'expression relative très proche, si l'on compare chaque groupe individuellement (Figures 24A-B).

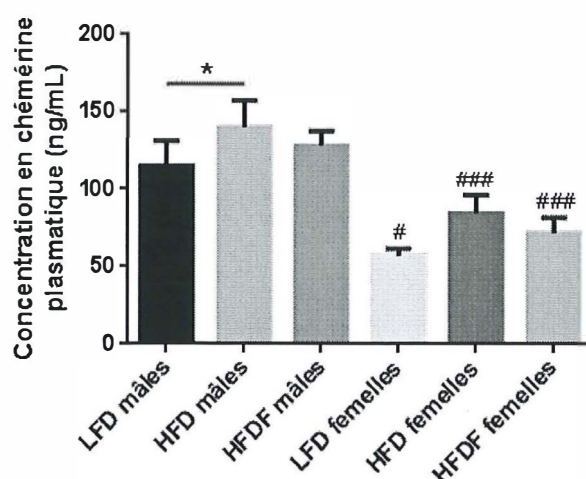


**Figure 24.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur l'expression relative ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) d'ARNm codant pour les *récepteurs de l'adiponectine* A) *AdipoR1* et B) *AdipoR2* dans le tissu rénal des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. #p<0,05, ##p<0,01 entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

## 2.3. Chémérine

Une évaluation de la concentration plasmatique en chémérine et une RT-qPCR ont été effectuées pour déterminer les impacts du régime et du genre sur cette adipokine. De plus, une étude de ses récepteurs a été réalisée à l'aide d'une RT-qPCR et un Western Blot.

La Figure 25 illustre les concentrations plasmatiques en chémérine suivant le régime et le genre. Une augmentation significative de sa concentration est mise en évidence dans le groupe de souris mâles HFD en comparaison avec les souris mâles LFD ( $p < 0,05$ ). Le groupe de souris mâles HFDF suit la même tendance que celui des mâles HFD, sans toutefois atteindre un seuil statistique. Aucune différence n'est observée entre les groupes de souris femelles concernant la concentration plasmatique en chémérine, même si une tendance semblable à celle observée chez les mâles semble se dégager. Il semble clair qu'une différence entre les sexes existe. En effet, les femelles de tous les groupes ont une concentration plasmatique en chémérine inférieure à celle des mâles et ce, quel que soit le régime (LFD :  $p < 0,05$  ; HFD et HFDF :  $p < 0,001$ , respectivement).

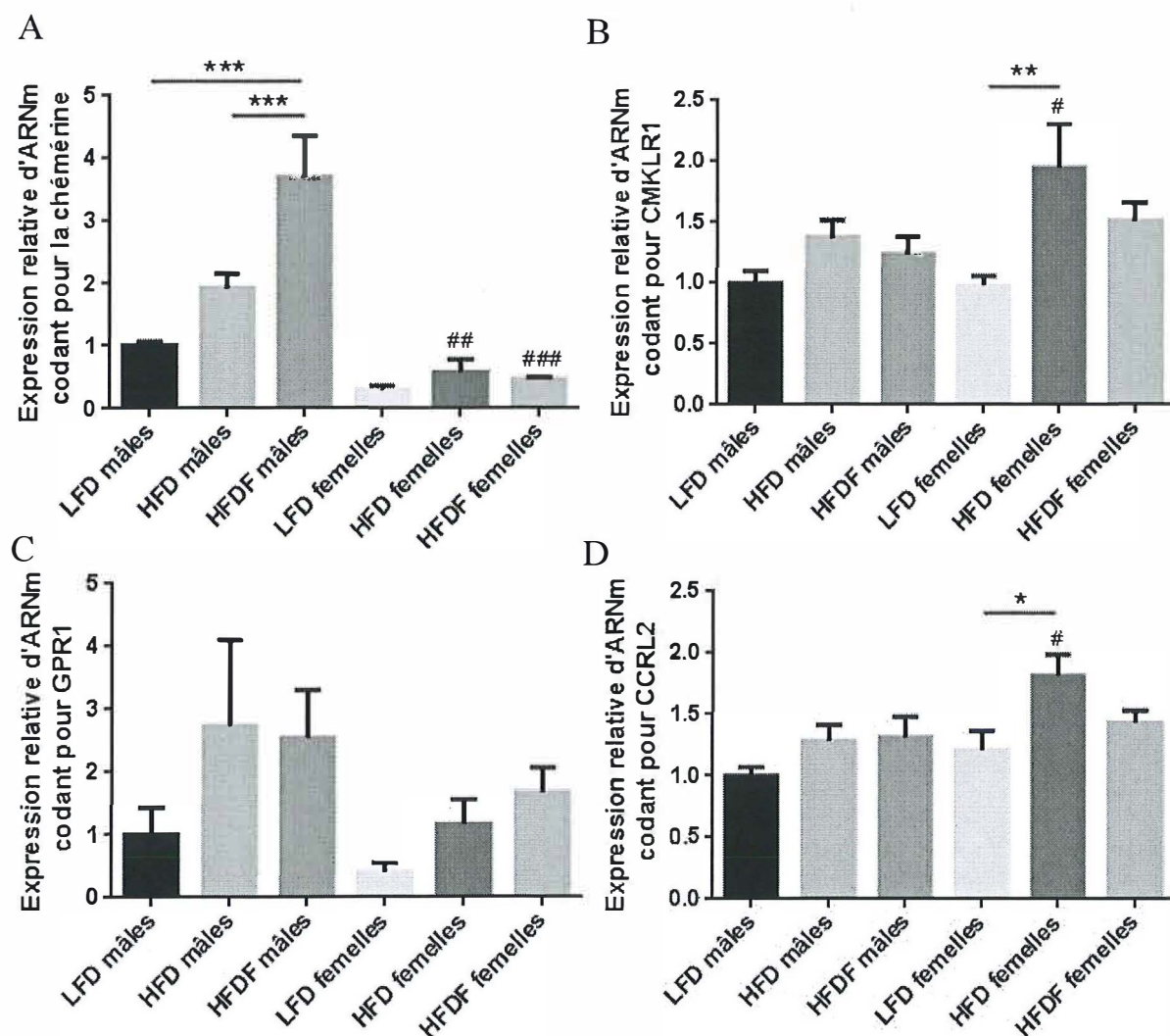


**Figure 25.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur les concentrations plasmatiques en chémérine des souris des groupes LFD ( $n = 6$ ), HFD ( $n = 6$ ) et HFDF ( $n = 7$ ) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \* $p < 0,05$  entre les groupes du même sexe ; # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

Pour déterminer les changements causés par le régime riche en graisse et le genre sur les niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour la *chémérine* et ses *récepteurs* dans les reins, une RT-qPCR a été réalisée. Comme l'illustre la Figure 26A, les niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour la *chémérine* des groupes de souris mâles HFD et HFDF sont plus élevés que dans le groupe de souris mâles LFD, mais cette augmentation n'atteint un niveau statistique que pour le groupe de souris mâles HFDF ( $p < 0,001$ ). En outre, le niveau d'expression relatif d'ARNm codant pour la *chémérine* est presque deux fois supérieur chez les souris mâles supplémentées avec du fructose, en comparant les groupes HFD et HFDF ( $p < 0,001$ ). Cependant, aucune variation quant à son expression dans le rein n'est observée entre les groupes de souris femelles. Si l'on s'intéresse à la différence entre les sexes, on remarque que l'expression relative d'ARNm codant pour la *chémérine* est nettement supérieure chez les mâles et ce pour tous les groupes, en comparaison aux femelles suivant les mêmes régimes. Néanmoins, seuls les mâles HFD et HFDF présentent une augmentation significative par rapport aux femelles (HFD :  $p < 0,01$  et HFDF :  $p < 0,001$ , respectivement).

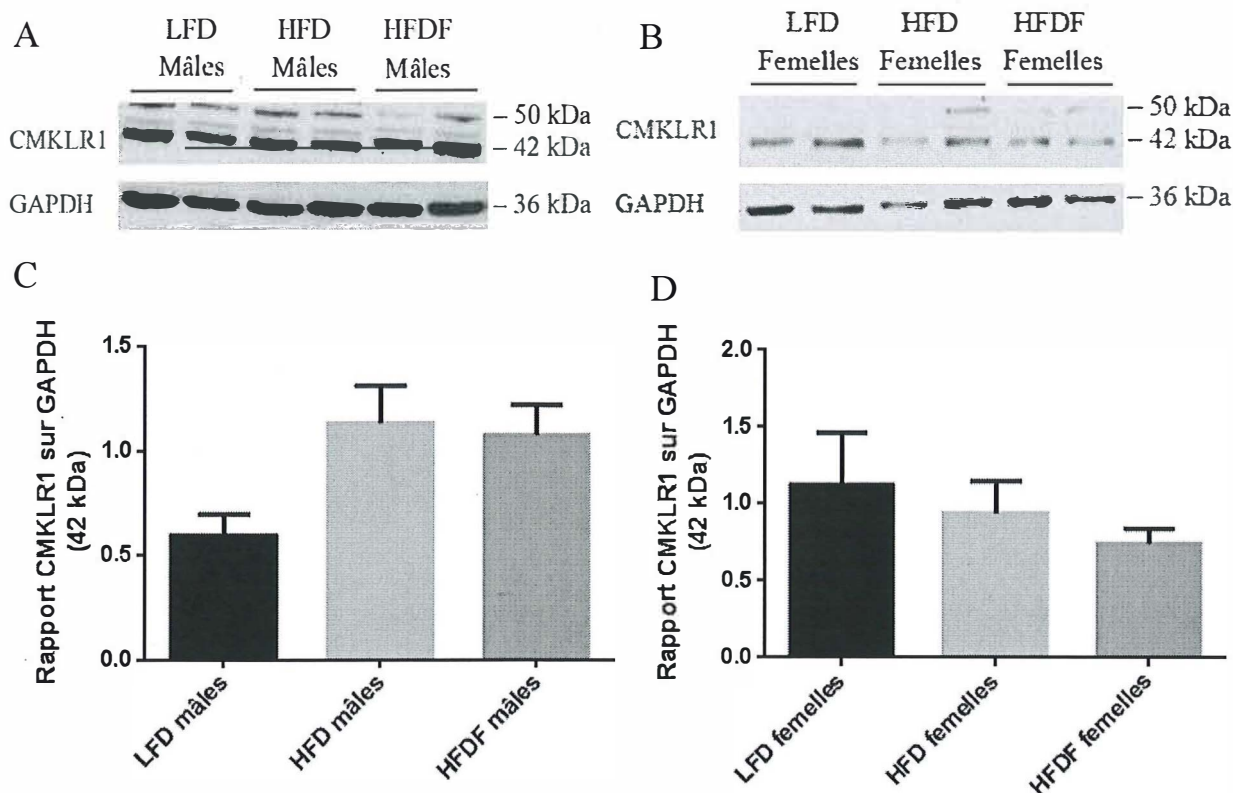


Concernant les niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour les *récepteurs de la chémérine* (*CMKLR1*, *GPR1* et *CCRL2*) dans les reins, aucune variation statistique n'est observée entre les différents groupes de souris mâles malgré une tendance à la hausse chez les souris soumises à un régime riche en graisse (Figures 26B-D). Il en est de même pour l'expression relative d'ARNm codant pour *GPR1* chez les femelles. Toutefois, une augmentation de l'expression relative d'ARNm codant pour *CMKLR1* et *CCRL2* est mise en évidence dans les groupes de souris femelles HFD en comparaison avec les femelles LFD (*CMKLR1*:  $p < 0,01$  et *CCRL2*:  $p < 0,05$ , respectivement). Une légère augmentation est également observée pour l'expression relative d'ARNm codant pour *CMKLR1* avec le régime HFDF en comparaison au régime LFD chez les femelles, sans pour autant rejoindre un niveau statistique. Une différence mâles/femelles apparaît concernant les niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour *CMKLR1* et *CCRL2* chez les animaux HFD en faveur d'une augmentation pour les femelles ( $p < 0,05$ ).



**Figure 26.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur l'expression relative ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) d'ARNm codant pour A) la *chémérine* et ses *récepteurs* B) *CMKLR1*, C) *GPR1* et D) *CCRL2* dans le tissu rénal des souris des groupes LFD ( $n = 6$ ), HFD ( $n = 6$ ) et HFDF ( $n = 7$ ) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  entre les groupes du même sexe ; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

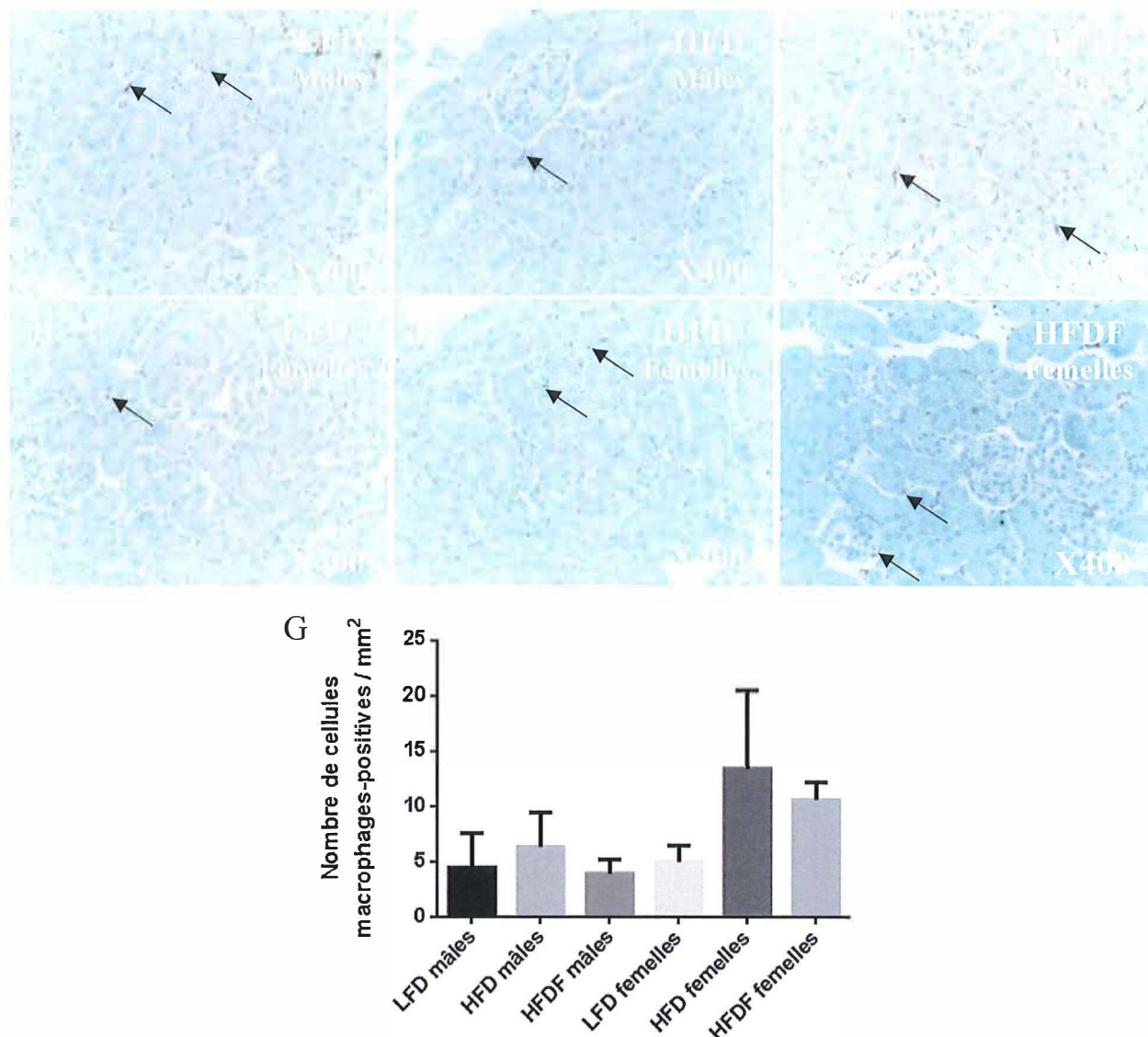
Un Western Blot a été effectué pour évaluer de façon semi-quantitative la présence du récepteur CMKLR1 dans le rein, mais aussi pour éventuellement mettre en évidence une réaction tissulaire à l'augmentation de l'expression relative d'ARNm codant pour la *chémérine* ou de sa concentration plasmatique liée à l'obésité. Aucune variation significative dans la détection de CMKLR1, selon le régime alimentaire et le genre, n'a été démontrée. Cependant, une légère augmentation de la densitométrie de la protéine a pu être observée en réponse au régime HFD et HFDF chez les mâles alors que la tendance inverse a été observée chez les femelles sans que cette évolution n'atteigne une signification statistique (Figures 27A-D).



**Figure 27.** Western Blot de CMKLR1 et de la GAPDH des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) A) mâles et B) femelles à la semaine 16 ; Concentrations en CMKLR1 normalisées par rapport à la GAPDH dans les reins de souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) C) mâles et D) femelles à la semaine 16. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak : NS.

## 3. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'inflammation

Dans le but d'évaluer le degré de la réponse inflammatoire au niveau du tissu rénal dans ce modèle d'obésité induit par le régime alimentaire et l'influence du genre sur ce paramètre, une analyse immunohistochimique visant à mettre en évidence les macrophages a été exécutée. Cette méthode permet de semi-quantifier l'infiltration de macrophages dans le tissu rénal (Figures 28A-F). Les flèches montrent les cellules marquées positivement pour le marquage anti-macrophages. Bien qu'une tendance à l'augmentation de la présence de macrophages soit observée chez les femelles, aucune différence significative de marquage n'a été mise en évidence suivant les différents régimes dans les groupes des deux sexes (Figure 28G). Cette constatation est aussi applicable quant à la différence entre les mâles et les femelles.

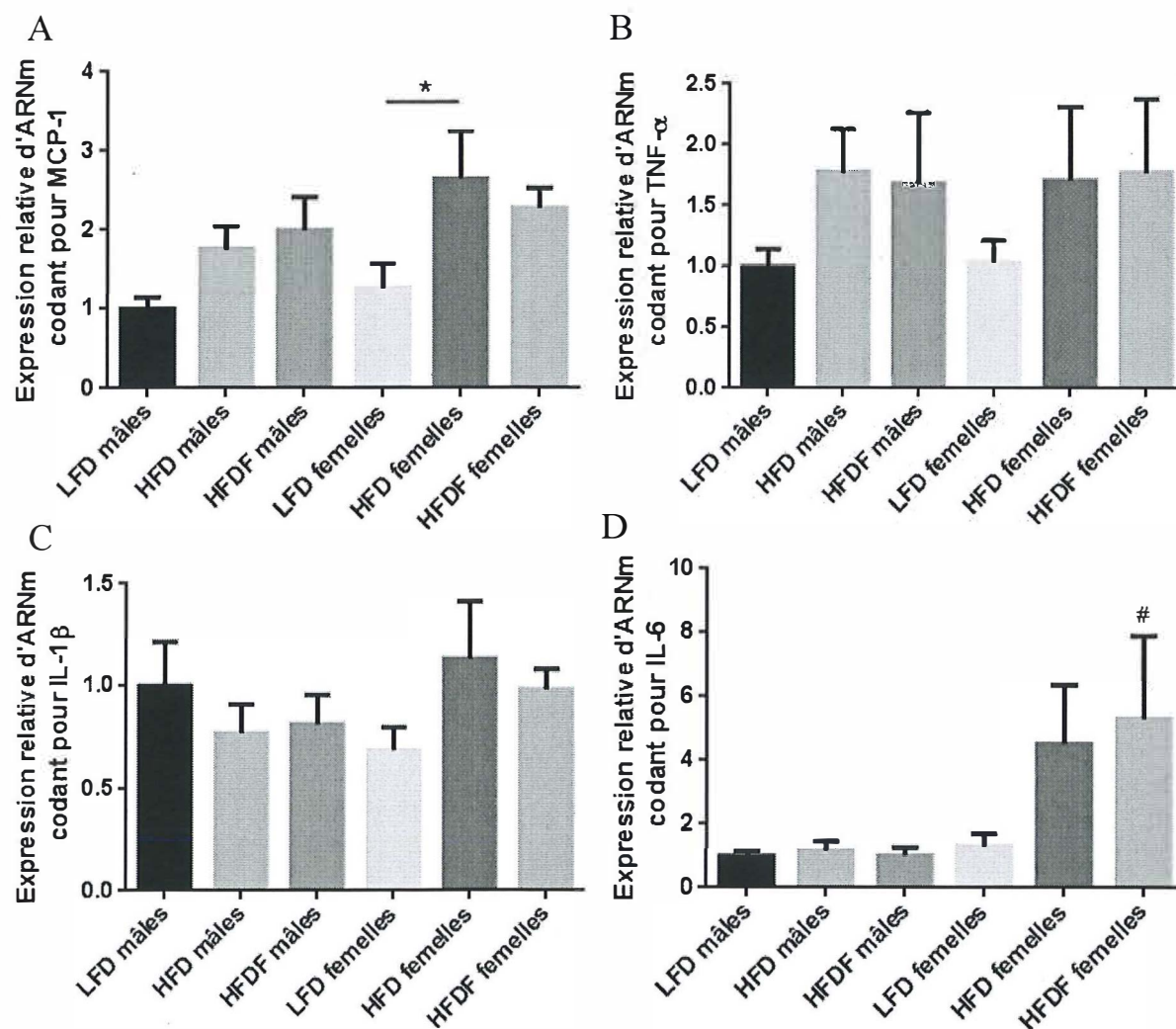


**Figure 28.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur l'infiltration de macrophage. Photographies représentatives des macrophages par détection immunohistochimique au sein du tissu rénal des souris appartenant aux groupes A) LFD mâles (n = 6) ; B) LFD femelles (n = 6) ; C) HFD mâles (n = 6) ; D) HFD femelles (n = 6) ; E) HFDF mâles (n = 7) ; F) HFDF femelles (n = 7) à la semaine 16 ; Grossissement 400x. Les flèches (→) montrent les cellules macrophages-positives. G) Quantification des cellules macrophages-positives par mm<sup>2</sup> de tissu dans les sections de rein des souris appartenant aux groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak : NS.

Toujours dans l'optique d'évaluer la réponse inflammatoire, des analyses de l'expression relative des transcrits codant pour *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  et *IL-6* ont été réalisées grâce à la méthode de RT-qPCR détaillée dans la rubrique Matériels et Méthodes (Figures 29A-D). Le niveau d'expression relatif d'ARNm codant pour *MCP-1* est plus élevé chez les femelles HFD et HFDF par rapport aux femelles LFD, même si cette augmentation atteint un seuil statistique uniquement pour les femelles HFD ( $p < 0,05$ ). Une tendance allant dans le même sens est observée pour l'expression relative d'ARNm codant pour *MCP-1* dans les groupes de souris mâles HFD et HFDF en comparaison des souris mâles LFD, sans atteindre un seuil statistique. De plus, malgré une tendance à l'augmentation des niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour le *TNF- $\alpha$*  avec un régime riche en graisse (HFD et HFDF), celle-ci ne rejoint pas un seuil statistique à la fois parmi les souris mâles et femelles. Il



n'existe pas non plus de différence entre les sexes pour ces deux paramètres. En ce qui concerne le niveau d'expression relatifs d'ARNm codant pour l'*IL-6*, il ne semble pas y avoir de différence entre les différents groupes de souris mâles. À l'opposé, les femelles nourries avec un régime HFD ou HFDF montrent une tendance à exprimer davantage l'ARNm codant pour l'*IL-6* en comparaison avec les souris du groupe LFD, et ce même si cette augmentation ne rejoint pas un niveau statistique suffisant. De plus, une différence est visible entre les mâles et les femelles HFD et HFDF quant à l'expression relative d'ARNm codant pour l'*IL-6*. Cette augmentation observée chez les femelles n'atteint un seuil significatif que pour les femelles HFDF ( $p < 0,05$ ). Enfin, l'expression relative d'ARNm codant pour l'*IL-1 $\beta$*  ne semble pas varier entre les différentes conditions.

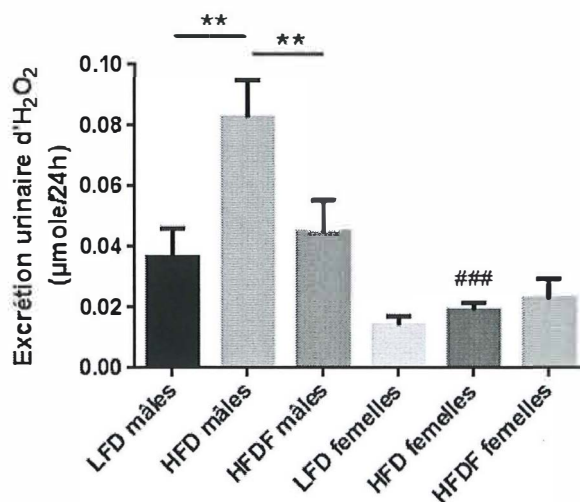


**Figure 29.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur l'inflammation. Expression relative (2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>) d'ARNm codant pour A) *MCP-1*, B) *TNF-α*, C) *IL-1β* et D) *IL-6* dans le tissu rénal des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \* $p < 0,05$  entre les groupes du même sexe ; # $p < 0,05$  entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

## 4. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur le stress oxydatif

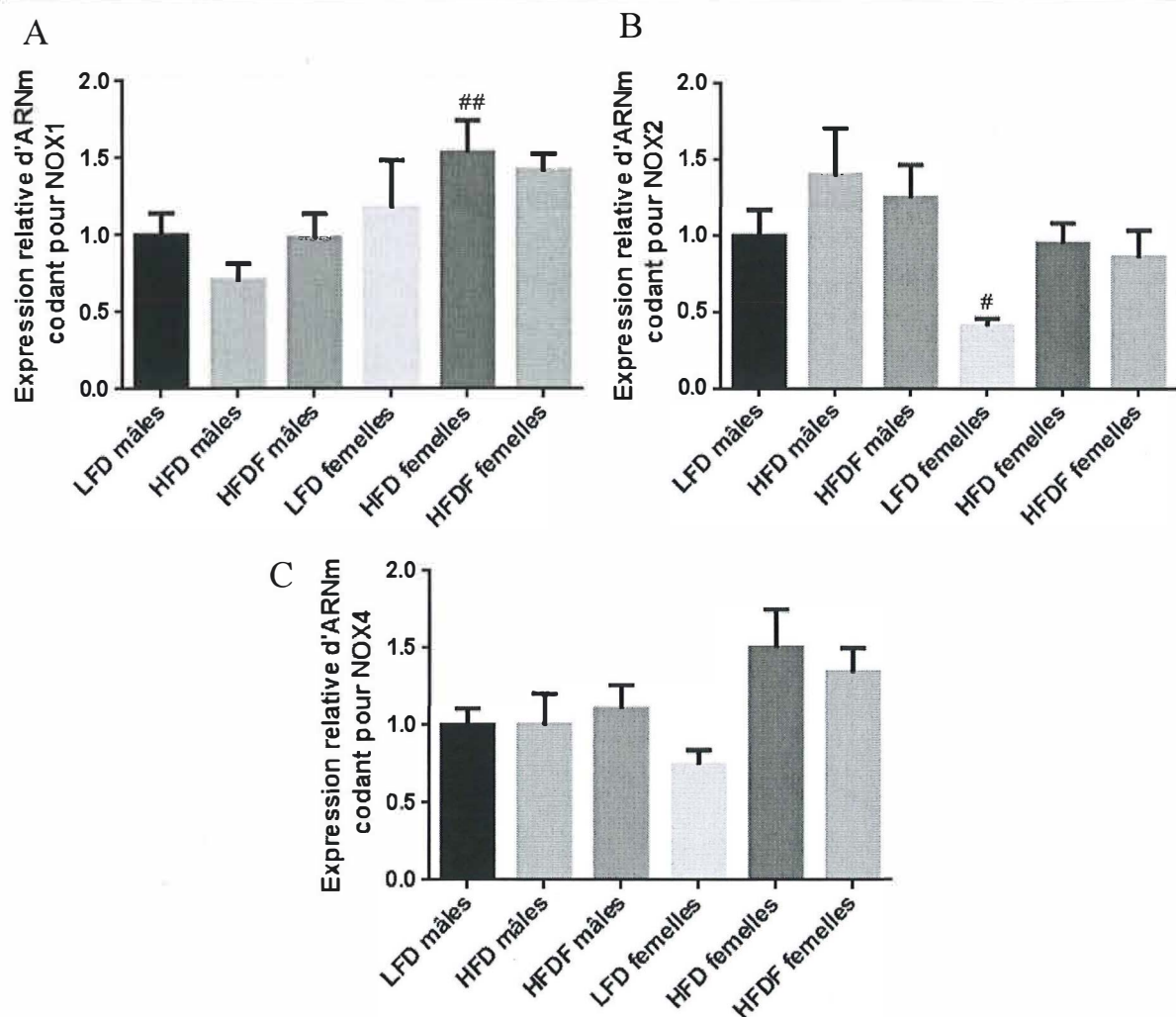
Dans le but de déterminer si un régime riche en graisse et le genre influencent les marqueurs du stress oxydatif, les niveaux urinaires de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ont été mesurés à la semaine 16 du protocole expérimental et ce pour les différents groupes (Figure

30). Il en ressort que les souris du groupe de mâles HFD présentent une excrétion urinaire d' $\text{H}_2\text{O}_2$  significativement plus importante que les mâles LFD et HFDF ( $p < 0,01$ ). De plus, cette excrétion est également supérieure chez les individus mâles par rapport aux individus femelles. Cependant, cette différence ne rejoint un seuil significatif que pour les souris mâles versus femelles appartenant aux groupes HFD ( $p < 0,001$ ). Aucune autre différence significative n'a pu être mise en évidence entre les autres groupes.



**Figure 30.** Effet d'un régime riche en graisse et du genre sur le stress oxydatif. Excrétion urinaire de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) des souris des groupes LFD ( $n = 6$ ), HFD ( $n = 6$ ) et HFDF ( $n = 7$ ) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \*\*  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les groupes.

Dans le but d'apporter de plus amples informations quant au développement potentiel d'un stress oxydatif liée à l'obésité et l'impact du genre dans ce modèle, l'expression relative d'ARNm des gènes *NOX1*, *NOX2* et *NOX4* a été évaluée grâce à une RT-qPCR. L'expression relative de ces trois transcrits ne présente pas de variation significative ni chez les mâles, ni chez les femelles suivant les différents régimes (Figures 31A-C). Cependant, le niveau d'expression relatif d'ARNm codant pour *NOX2* chez les souris mâles nourries avec un régime HFD et HFDF montre une tendance à l'augmentation par rapport aux souris mâles LFD. De plus, une tendance à la hausse de l'expression relative d'ARNm codant pour *ces trois gènes* semble également apparaître chez les souris femelles HFD et HFDF par rapport aux souris femelles LFD. Quant aux différences mâles/femelles, les niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour *NOX1* tendent à augmenter chez les souris femelles, mais cette constatation atteint une valeur statistique uniquement pour les souris HFD ( $p < 0,01$ ). À l'opposé, les niveaux d'expression relatifs d'ARNm codant pour *NOX2* semblent diminuer chez les souris femelles et rejoignent un seuil significatif pour les souris LFD uniquement ( $p < 0,05$ ). En ce qui concerne la différence lié au genre pour *NOX4*, deux tendances semblent s'opposer. La première montre une diminution, non significative, du niveau d'expression relatif de son ARNm chez les souris femelles LFD par rapport aux souris mâles LFD. Au contraire, les animaux femelles HFD et HFDF présentent un niveau d'expression relatif d'ARNm codant pour *NOX4* relativement augmenté par rapport aux mâles HFD et HFDF, sans atteindre un niveau statistique.



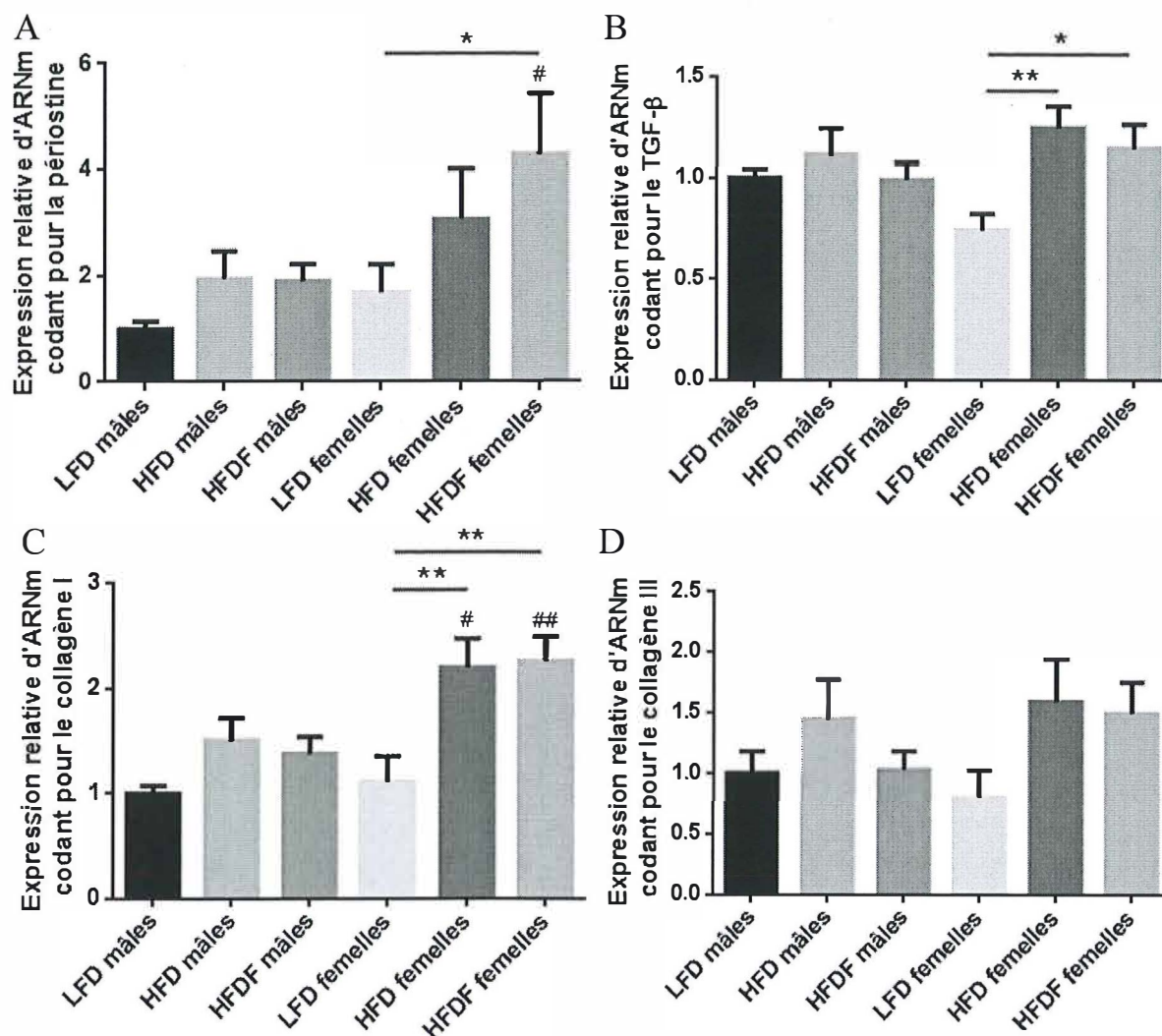
**Figure 31.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur le stress oxydatif. Expression relative ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) d'ARNm codant pour A) *NOX1*, B) *NOX2* et C) *NOX4* dans le tissu rénal des souris des groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. #p<0,05, ##p<0,01 entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

## 5. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur la fibrose

Une évaluation du développement de la fibrose rénale induite par le régime alimentaire, et en tenant compte de l'influence du genre a été réalisée. D'abord, plusieurs RT-qPCR ont été effectuées afin d'évaluer la variation de l'expression relative d'ARNm codant pour la *périostine*, le *TGF- $\beta$* , le *collagène de type I* et le *collagène de type III*, suivant le régime et le genre (Figures 32A-D). Aucune variation significative d'ARNm codant pour *ces quatre protéines* n'est observée entre les différents régimes chez les mâles. Une tendance en faveur d'une augmentation de l'expression relative d'ARNm codant pour la *périostine* avec un régime riche en graisse reste tout de même présente chez les mâles. En ce qui concerne l'impact du régime chez les femelles, une augmentation de l'expression relative d'ARNm codant pour le *TGF- $\beta$*  et du *collagène de type I* est recensée chez les souris femelles HFD et HFDF en comparaison aux femelles LFD (*collagène de type I* : p<0,01 ; *TGF- $\beta$*  : HFD : p<0,01 et HFDF : p<0,05). De plus, l'expression relative d'ARNm codant pour la *périostine* a aussi tendance à augmenter avec un régime HFD et HFDF chez les femelles, mais ne rejoint un seuil statistique uniquement pour le groupe de souris femelles HFDF (p<0,05). Pour terminer, l'ARNm du *collagène de type I* est plus exprimé chez les femelles HFD et HFDF que chez leurs homologues mâles (HFD : p<0,05 et HFDF p<0,01), alors qu'il n'existe

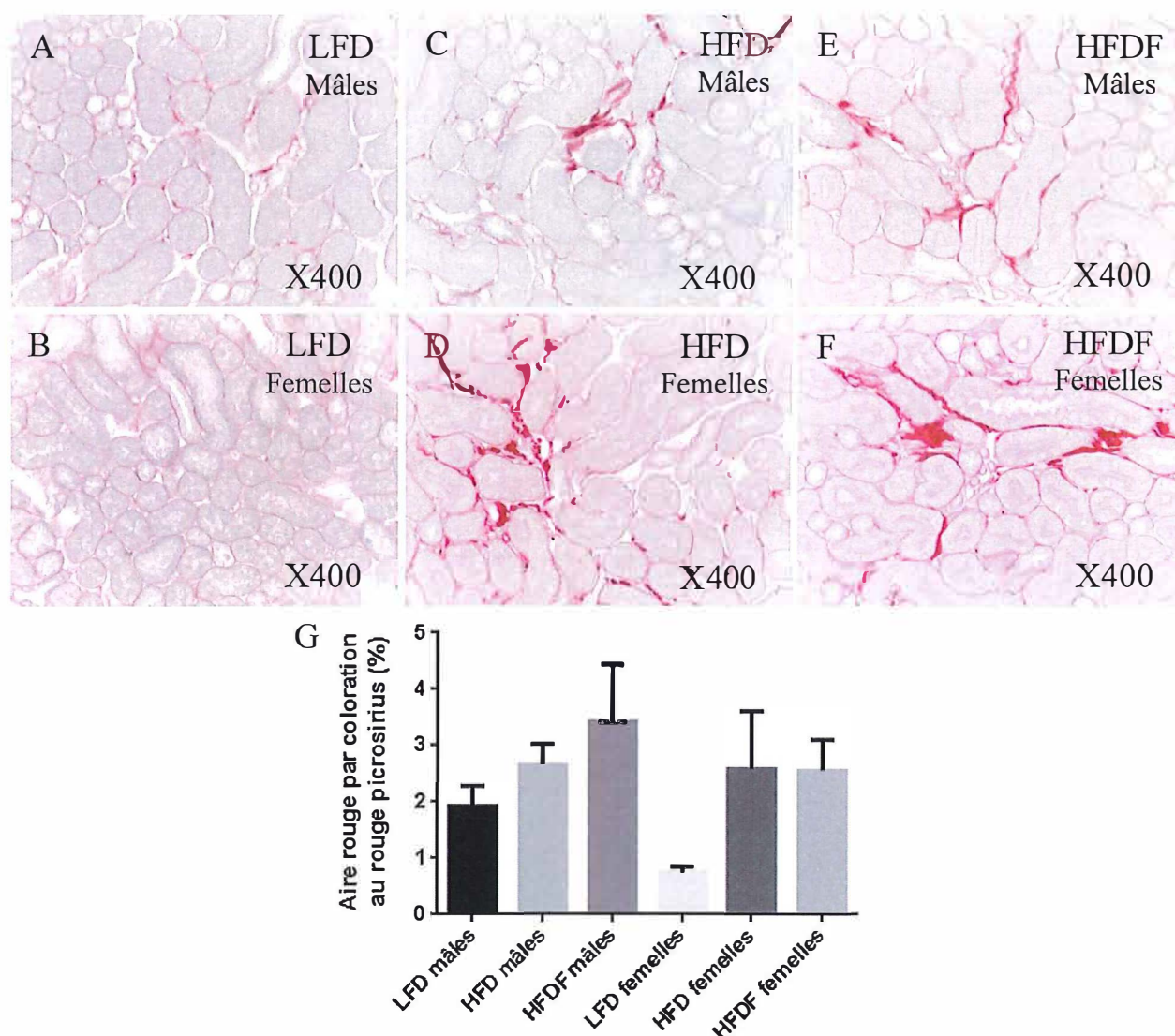


aucune différence d'expression relative d'ARNm codant pour le *TGF-β* entre les mâles et les femelles suivant le même régime. L'expression relative d'ARNm codant pour la *périostine* est également plus importante chez les femelles HFDF que chez les mâles HFDF ( $p<0,05$ ). Aucune différence statistique n'est observée en ce qui concerne l'expression relative d'ARNm codant pour le *collagène de type III* entre les différents régimes et les sexes.



**Figure 32.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur la fibrose rénale. Expression relative ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) d'ARNm codant pour A) la *périostine* B) le *TGF-β*, C) le collagène de type I, D) le collagène de type II dans le tissu rénal des souris des groupes LFD ( $n = 6$ ), HFD ( $n = 6$ ) et HFDF ( $n = 7$ ) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak. \* $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  entre les groupes du même sexe ; # $p<0,05$  ; ## $p<0,01$  entre les groupes suivant le même régime et de sexe opposé.

Enfin, une coloration au rouge picosirius a été effectuée afin de réaliser une analyse semi-quantitative de la fibrose rénale (Figures 33A-F). Comme illustré sur la Figure 33G, l'aire positive au marquage rouge picosirius sur les sections de rein tend à augmenter avec un régime riche en graisse (HFD et HFDF) aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Toutefois, cette tendance ne rejoint un seuil significatif pour aucune des conditions, y compris pour la différence entre les sexes.



**Figure 33.** Effet du régime riche en graisse et du genre sur la fibrose rénale. Photographies représentatives d'une coloration au rouge picrosirius du tissu rénal des souris appartenant aux groupes A) LFD mâles (n = 6) ; B) LFD femelles (n = 6) ; C) HFD mâles (n = 6) ; D) HFD femelles (n = 6) ; E) HFDF mâles (n = 7) ; F) HFDF femelles (n = 7) à la semaine 16 ; Grossissement 400x. G) Quantification de la surface marquée au rouge picrosirius dans les sections de rein des souris appartenant aux groupes LFD (n = 6), HFD (n = 6) et HFDF (n = 7) mâles et femelles à la semaine 16. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par une ANOVA II suivie de la méthode de comparaison Holm-Sidak : NS.

# Discussion



L'obésité est une maladie complexe résultant, entre autres, d'un apport calorique excessif mais aussi de la sédentarité observée dans les pays occidentaux. Cette pathologie métabolique, maintenant considérée comme épidémique, est devenue un problème majeur de santé publique en raison de l'augmentation croissante de sa prévalence au cours des dernières décennies et du fardeau économique qu'elle représente (Flegal et al. 2014). C'est pourquoi un nombre croissant d'études sont menées afin de comprendre les mécanismes sous-jacents conduisant aux complications liées à l'obésité, telles que le syndrome métabolique, le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires et l'insuffisance rénale chronique (Bruce & Byrne 2009; Felizardo et al. 2014; Kaur 2014). L'un des mécanismes proposés suggère que le tissu adipeux, en cas d'obésité, sécrète de façon anormale plusieurs adipokines telles que la leptine, l'adiponectine et la chémérine, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Cette modification du profil de sécrétion pourrait ainsi contribuer aux troubles métaboliques et aux co-morbidités (Rabe & Lehrke 2008; Wozniak et al. 2009; Nakayama & Wang 2010; Van De Voorde et al. 2013; Nakamura et al. 2014). De récentes découvertes concernant l'implication de la leptine, de l'adiponectine et de la chémérine dans l'insuffisance rénale induite par l'obésité nous ont amenés à explorer leur rôle potentiel dans cette pathologie (Roh et al. 2007; Ernst & Sinal 2010; Eknoyan 2011; Felizardo et al. 2014; Nashar & Egan 2014; Bonomini & Pandolfi 2015).

### 1. Caractérisation du modèle d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisse et évaluation de l'impact du genre

Le premier objectif de cette étude est de caractériser notre modèle. Cette caractérisation passe par une évaluation de l'impact des différents régimes et du genre sur les paramètres métaboliques, mais aussi sur la fonction et la structure rénales.

#### 1.1. Paramètres métaboliques

L'augmentation du poids corporel (PC) observée chez les souris C57Bl/6 mâles et femelles nourries avec un régime LFD est un processus physiologique reflétant leur croissance. Cependant, l'augmentation relative du PC est plus importante et plus précoce chez les souris nourries avec un régime HFD ou HFDF, aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Contrairement aux souris femelles, cette évolution est plus marquée chez les souris mâles HFDF à partir de la douzième semaine, montrant un effet du fructose dans l'eau de boisson sur le gain de PC chez les souris mâles. Cette augmentation résulterait d'un excès d'apport en graisse fourni par les régimes alimentaires HFD et HFDF, conduisant à une accumulation de lipides dans le tissu adipeux et donc une augmentation de la masse corporelle. Toutefois, lorsque l'apport alimentaire dépasse la capacité de stockage des acides gras par les adipocytes, il survient un phénomène de saturation du tissu adipeux. Cette dernière induit la libération subséquente des acides gras en excès dans le compartiment sanguin, conduisant à leur accumulation dans des sites ectopiques tels que le foie, le cœur et les reins (Bruce & Byrne 2009). Cette considération semble cohérente avec l'augmentation de la masse des reins et du cœur mais aussi du foie observée chez les mâles. Elle traduirait ainsi un dépôt ectopique de lipides dans ces organes, conduisant à leur hypertrophie. Chez les femelles, seul le poids du foie est impacté par les régimes riches en graisse (HFD et HFDF), concordant avec une infiltration ectopique de lipides dans les hépatocytes et donc le développement d'une stéatose hépatique non-alcoolique (Bruce & Byrne 2009). Même si aucune différence n'a été observée concernant l'augmentation relative du PC entre les mâles et les femelles, le poids du cœur, des reins et du foie reste nettement inférieur chez les femelles nourries avec un régime riche en graisse par rapport aux mâles. Ces données nous laissent présumer que le genre, et donc les hormones sexuelles, influence l'accumulation ectopique de lipides dans ces organes. En effet, les mâles et les femmes post-

ménopausées ont tendance à accumuler plus de graisse viscérale alors que les femelles pré-ménopausées accumulent plus de graisse au niveau sous-cutané, réduisant ainsi les dépôts ectopiques de lipides dans les organes clés (Power & Schulkin 2008; White & Tchoukalova 2014; Palmer & Clegg 2015). Ce dimorphisme sexuel, quant à la répartition grasseuse, pourrait donc expliquer pourquoi les mâles sont plus sujets à développer une accumulation ectopique de graisse dans les organes périphériques.

L'augmentation de la glycémie à jeun avec les régimes riches en graisse observée, tant chez les mâles que chez les femelles, évoque que ces deux régimes riches en lipides exercent un effet sur le métabolisme du glucose. En outre, l'augmentation de l'insulinémie, même si elle n'est pas significative, reste toutefois cohérente avec le développement d'une résistance à l'insuline dans les groupes HFD et HFDF. En effet, le développement de l'obésité est régulièrement accompagné d'une augmentation de la glycémie à jeun, ainsi que du taux d'insuline plasmatique. Ces deux phénomènes traduisent une résistance à l'insuline, menant le plus souvent à l'émergence du diabète de type II (Bruce & Byrne 2009; Nakayama & Wang 2010; Nashar & Egan 2014; Prasad 2014; O'Neill et al. 2016). Néanmoins, cette réponse moins perceptible chez les femelles semble plutôt souligner que l'hyperglycémie se situe à un stade précoce de développement (Winzell & Ahren 2004). Ces résultats sont cohérents avec les observations de l'étude de Pettersson et al. (2012) dans laquelle les souris femelles nourries avec un régime riche en graisse semblent être protégées des altérations du métabolisme, telles que l'intolérance au glucose et l'hyperinsulinémie, par rapport aux mâles soumis au même traitement. Cette constatation pourrait être expliquée par la plus faible accumulation ectopique de lipides dans le foie des femelles par rapport aux mâles nourris avec un régime riche en graisse. En effet, les perturbations métaboliques, telles que la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie, sont associées à une certaine lipotoxicité causée par l'accumulation ectopique de lipides dans le foie (Rossmeisl et al. 2003). La stéatose hépatique étant moins observée chez les souris femelles, induirait des altérations métaboliques plus faibles. Par ailleurs, les femelles nourries avec un régime riche en graisse posséderaient une plus grande sensibilité à l'insuline leur conférant une plus grande résistance à ce type régime et aux altérations métaboliques qui en découlent (Varlamov et al. 2014).

Ces résultats sont donc en accord avec le développement d'un trouble métabolique et démontrent la pertinence de notre modèle d'obésité induit par l'alimentation chez les souris mâles et femelles C57Bl/6, même si l'impact métabolique semble plus important chez les mâles.

### 1.2. Structure et fonction rénale

Plusieurs études ont mis en évidence que l'obésité constitue un facteur de risque important pour le développement progressif de maladies rénales (Praga et al. 2000; Eknayan 2011). L'analyse histologique des reins de souris provenant des différents groupes a permis de mettre en évidence une vacuolisation importante des cellules tubulaires proximales S1 et S2, dans les groupes de souris mâles HFD et HFDF. Ces résultats concordent avec ceux rapportés dans l'étude de Ma et al. (2011) montrant une vacuolisation dans les tubules proximaux de souris obèses nourries avec un régime HFD. Ces vacuoles refléteraient des lésions tubulaires, qui pourraient mener à terme à une atrophie tubulaire et à des changements structuraux dégénératifs (Li et al. 2011). Selon Declèves et al. (2014), ces vacuoles seraient constituées d'une accumulation de cholestérol et de phospholipides. Cependant, leur composition exacte reste incertaine et nécessite des investigations complémentaires. Cette même étude émet l'hypothèse que ces vacuoles résulteraient d'un dysfonctionnement du système lysosomal et d'une altération du métabolisme des lipides causée par un régime riche en graisse. En effet, en cas d'obésité, il existe, au niveau rénal, un déséquilibre entre la lipolyse et la lipogenèse menant à une



accumulation de lipides (Kume et al. 2007). Cependant, le mécanisme exact par lequel ces vacuoles se développent reste à préciser. Fait intéressant, ces vacuoles ne semblent pas être présentes chez les souris femelles, y compris celles nourries avec un régime riche en graisse. Cette constatation pourrait être associée au fait que les souris femelles sont moins sujettes à l'accumulation ectopique de graisse et donc pourraient ne pas présenter ces vacuoles lipidiques. Ces hypothèses doivent cependant être validées. Par exemple, il serait possible d'augmenter la teneur en graisse du régime des souris femelles afin de dépasser davantage la capacité de stockage du tissu adipeux et ainsi mener à une plus grande accumulation ectopique de graisse. Dans ce modèle, les glomérules rénaux sont également atteints et présentent les caractéristiques typiques des lésions induites par l'obésité. Effectivement, une augmentation de la taille du glomérule accompagnée d'un épaississement de la membrane glomérulaire mais aussi d'une dilatation des capillaires et de la capsule de Bowman sont les lésions couramment observées lors de l'obésité (Goumenos et al. 2009; Declèves et al. 2014). Cette glomérulosclérose est généralement associée à une expansion de matrice mésangiale, causée par l'hyper-activation des cellules mésangiales en réponse à divers stimuli comme une augmentation de la glycémie. En effet, l'hyperglycémie induit la sécrétion du TGF- $\beta$  par les cellules mésangiales. Il en résulte une production excessive de fibronectine et de collagène de type I et IV par ces mêmes cellules (Abrass 1995; Lee 2011).

Les lésions rénales associées à l'obésité sont souvent accompagnées d'une altération de la fonction rénale. Dans notre étude, le DFG, un paramètre très utilisé pour l'évaluation de la fonction rénale, est plus élevé chez les mâles suivant un régime riche en graisse que chez les femelles, traduisant un impact plus important de ce régime sur la fonction rénale des souris mâles. Ce résultat n'atteignant pas le seuil statistique, il est difficile d'interpréter ce résultat mais il reste cependant en accord avec l'étude de Chagnac et al. (2000) qui démontre que le DFG est d'autant plus élevé que les sujets sont obèses. Cette étude suggère également que l'accroissement du DFG pourrait être le résultat d'une augmentation de la pression intra-glomérulaire, causée par une hypertension et une dilatation de l'artériole afférente. Il serait donc intéressant, lors d'une prochaine étude, de mesurer la pression artérielle des souris appartenant aux différents groupes pour confirmer cette hypothèse. Le paramètre suivant examiné lors de cette étude est la diurèse, représentant volume urinaire excrété par 24h. Une diminution de la diurèse a été constatée dans les groupes femelles HFD et HFDF par rapport aux mâles HFD et HFDF. Ces résultats, traduisant une plus grande capacité de concentration des urines et donc une augmentation de l'osmolarité urinaire, pourraient découler de la présence d'une plus faible quantité de glucose dans les urines par rapport aux mâles (Guyton & Hall 2006). En effet, les mâles obèses présentant une glycémie à jeun plus élevée, la quantité de glucose dans les urines sera donc plus importante. Les tubules rénaux proximaux ayant une capacité limitée de réabsorption du glucose et ce dernier possédant une forte pression osmotique va augmenter la diurèse et donc diminuer l'osmolarité urinaire et ce, d'autant plus que la glycosurie sera élevée (Guyton & Hall 2006). La protéinurie et l'albuminurie servent également de marqueurs de lésions rénales, reflétant des altérations de la barrière de filtration ou de la réabsorption tubulaire. Ces deux paramètres sont connus pour augmenter dans le cadre l'obésité (Lea et al. 2008; Eknayan 2011). Dans cette étude, seule la protéinurie tend à augmenter avec un régime riche en graisse, que ce soit chez les mâles ou les femelles sans pour autant atteindre le seuil statistique. Ces résultats ne permettent pas de tirer de conclusion mais sont en accord avec d'autres études dans lesquelles une augmentation de la protéinurie a été observée en corrélation avec l'augmentation du PC et serait causée par une hyperfiltration glomérulaire (Praga et al. 2000; Lea et al. 2008; Eknayan 2011; Felizardo et al. 2014). La protéinurie est également plus élevée chez les mâles que chez les femelles, comme observé dans l'étude de Wick (1941) qui a



analysé la quantité des différentes protéines présentes dans les urines de souris mâles et femelles de plusieurs souches différentes. Toujours selon cette étude, il semblerait que la testostérone jouerait un rôle dans cette différence liée au genre, mais les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été élucidés.

Dans notre étude, le BUN tend à diminuer avec l'apport calorique, aussi bien chez les mâles que les femelles. Cette constatation est surprenante, car le BUN, qui est un indicateur de la capacité de filtration des reins, est supposé augmenter avec une altération de la fonction rénale (Chen et al. 2011). En revanche, dans notre modèle, le BUN seul n'est pas un bon indicateur de la fonction rénale car il peut être modifié par plusieurs paramètres tels que l'alimentation, une maladie hépatique ou des saignements intestinaux (Wang et al. 2014). Dans notre étude, plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat inattendu. Dans un premier temps, une stéatose hépatique, comme cela est observé dans les groupes HFD et HFDF, pourrait induire une altération du métabolisme de l'urée et ainsi augmenter sa concentration plasmatique. Deuxièmement, le régime peut également être impliqué. En effet, puisque la quantité de protéines dans le régime alimentaire détermine la charge d'azote dans le corps, l'urée plasmatique peut varier en fonction de cet apport en protéines. Par conséquent, avec une excrétion urinaire constante, plus un régime alimentaire sera riche en protéines, plus la concentration plasmatique en urée sera élevée (Hammond & Janes 1998; Wang et al. 2014). Dans notre étude, étant donné que les souris nourries avec un régime riche en graisse ont tendance à manger moins, elles absorbent moins de protéines, bien qu'à l'origine leur nourriture contienne la même quantité de protéines dans tous les groupes. Une combinaison de ces deux hypothèses pourrait expliquer notre résultat. Les souris femelles présentent également un BUN plus faible que les souris mâles LFD. Ce résultat pourrait provenir du fait que les souris mâles produiraient plus d'urée en raison de la taille plus importante des organes produisant de l'urée (par exemple, foie et muscle squelettique), menant à une élévation plasmatique de cette dernière chez les mâles (Wang et al. 2014). Néanmoins, cette hypothèse reste à vérifier.

À la lumière de toutes ces données concernant les paramètres urinaires, nous pouvons conclure que les régimes riches en graisse possèdent un impact sur la structure et la fonction rénale dans notre modèle aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Les femelles semblent toutefois être moins impactées que les mâles.

## 2. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'expression des adipokines

Dans l'obésité, une dérégulation de la sécrétion de diverses adipokines par le tissu adipeux a été mise en évidence. Cette dérégulation pourrait jouer un rôle important dans le développement des pathologies liées à l'obésité (Wozniak et al. 2009; Van De Voorde et al. 2013; Felizardo et al. 2014; Kaur 2014). C'est à partir de cette hypothèse que nous avons décidé de nous pencher sur l'évolution des taux de la leptine, de l'adiponectine et de la chémérine suivant le régime, mais aussi suivant le genre.

### 2.1. La leptine

Chez les souris soumises à un régime riche en graisse, nous avons observé une augmentation de la concentration plasmatique en leptine. La leptine, étant sécrétée de façon proportionnelle à la masse grasseuse, augmente chez les patients obèses, menant à une hyperleptinémie (Praga et al. 2000; Rabe & Lehrke 2008; Hariri & Thibault 2010; Felizardo et al. 2014). Cette dernière serait causée par le développement d'une résistance à la leptine (Hariri & Thibault 2010; Felizardo et al. 2014). Effectivement, les souris suivant un régime HFD ou HFDF sont, dans un premier temps, sensibles aux effets anorexigènes de la leptine, réduisant ainsi leur apport

alimentaire. Malgré cela, les souris gagnent du poids, en raison de l'apport gras plus élevé de ces régimes, causant une augmentation de la production de leptine par le tissu adipeux et donc de sa concentration plasmatique. Cette augmentation à long terme finit par conduire à une insensibilité aux effets de la leptine (Hariri & Thibault 2010; Nakamura et al. 2014). En plus de ses effets anorexigènes et stimulant la dépense énergétique, la leptine est également impliquée dans la survenue de lésions rénales, via ses effets pro-inflammatoires et pro-oxydants. Elle serait ainsi impliquée dans le développement de la glomérulosclérose, mais aussi de la protéinurie induite par l'obésité, pouvant conduire à une insuffisance rénale chronique (Praga et al. 2000; Felizardo et al. 2014). En effet, l'administration de leptine chez des rats induirait une protéinurie et une glomérulosclérose via une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$  et un dépôt de collagène de type IV (Wolf et al. 1999; Praga et al. 2000). Cependant, de futures études sont nécessaires pour confirmer ces données et pour déterminer les mécanismes impliqués dans ce phénomène. Contrairement à d'autres, notre étude a mis en évidence une diminution des niveaux plasmatiques de leptine chez les souris femelles en comparaison aux mâles nourris avec un régime riche en graisse. Ces résultats sont donc en contradiction avec plusieurs études réalisées sur l'homme et les rats qui démontrent clairement que les concentrations plasmatiques en leptine augmentent de façon importante avec la masse grasse, et ce de façon plus importante chez les femelles que les mâles (Saad et al. 1997; Himms-Hagen 1999; Smith & Waddell 2003; Gui et al. 2004; Power & Schulkin 2008; Mauvais-Jarvis 2015). Néanmoins, l'implication des hormones sexuelles nécessite encore de nombreuses études, même si l'étude de Pinilla et al. (1999) suggère un effet stimulant des œstrogènes et de la progestérone et inhibant des androgènes sur la production de la leptine chez le rat. De plus, ces études étant réalisées chez l'humain et le rat, il est nécessaire de déterminer la pertinence de ces résultats par la reproduction de ce protocole chez la souris.

Le récepteur de la leptine est aussi bien exprimé dans l'hypothalamus qu'au niveau des reins suggère que la leptine exerce également des effets au niveau rénal (De Matteis et al. 1998; Stenvinkel et al. 1999). C'est dans cette optique que l'expression d'ARNm codant pour le *récepteur de la leptine* (*LepR*) a été évaluée. L'expression d'ARNm codant pour ce *récepteur* n'est que peu, voire pas, modifiée suivant le régime aussi bien chez les mâles que les femelles. Néanmoins, une différence entre les sexes peut être observée, à l'exception du groupe HFD. Cette différence illustre une augmentation de son expression chez les femelles et pourrait tirer son explication des effets hormonaux et de la puberté chez les souris mâles et femelles. Dans l'étude de Smith & Waddell (2003), réalisée sur des rats, les femelles post-pubères présentaient une expression plus élevée d'ARNm codant pour le *récepteur de la leptine* au niveau de l'hypothalamus, en comparaison avec des mâles du même âge. On peut donc émettre l'hypothèse qu'il existe une influence des hormones sexuelles sur l'expression d'ARNm codant pour le *LepR* au niveau rénal. Néanmoins, de plus amples investigations sont nécessaires pour apporter des réponses à cette constatation.

### 2.2. L'adiponectine

Dans le cadre de cette étude, l'impact du régime sur les concentrations rénales et plasmatiques en adiponectine reste minime. Contrairement à ce qui était attendu, la concentration plasmatique en adiponectine n'a pas évolué avec la prise de poids, peu importe le genre. En effet, il est maintenant accepté de tous que la concentration plasmatique en adiponectine diminue de façon significative en corrélation avec l'obésité, l'empêchant d'exercer correctement ses effets anti-inflammatoires et sensibilisant à l'insuline. Alors que le mécanisme induisant la diminution de sa concentration plasmatique n'est pas clairement établi, il semblerait que l'hypoxie du tissu adipeux, résultant d'une augmentation de la taille des adipocytes, soit un élément central (Van



De Voorde et al. 2013; Felizardo et al. 2014; Kaur 2014; Nakamura et al. 2014; Nashar & Egan 2014). Cette hypothèse est corrélée par l'étude de Hosogai et al. (2007) où une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour l'*adiponectine* est observée dans le tissu adipeux des souris obèses, mais aussi lorsque des adipocytes en culture 3T3-L1 sont placés en conditions hypoxiques. Dans notre modèle, comme les taux plasmatiques de l'adiponectine n'ont subi que peu de changements, l'adiponectine est capable exercer son rôle de sensibilisation à l'insuline de la même manière dans les différents groupes, les préservant du développement d'une résistance à l'insuline (Rabe & Lehrke 2008). Ceci pourrait expliquer, en partie, pourquoi nous n'avons observé qu'une faible variation de l'insulinémie dans les groupes HFD et HFDF aussi bien chez les mâles que chez les femelles. L'adiponectine protégerait également du développement et de la progression de l'albuminurie induite par l'obésité. Chez les sujets obèses, l'hypo-adiponectinémie, augmentant la production de ROS, provoquerait l'apoptose des podocytes associée à une augmentation de la microalbuminurie, traduisant un déclin de la fonction rénale (Goumenos et al. 2009; Sweiss & Sharma 2014; Christou & Kiortsis 2014). La concentration plasmatique en adiponectine ne subissant pas de modification dans notre modèle, ces données provenant de la littérature pourraient, tout du moins en partie, expliquer pourquoi l'albuminurie n'est pas modifiée avec les différents traitements expérimentaux. Cependant, ces hypothèses restent à confirmer et nécessitent d'autres analyses afin de décrypter les mécanismes impliqués dans ce phénomène. En outre, la concentration plasmatique en adiponectine semble être influencée par le genre. De fait, même si cette tendance rejoint le seuil statistique uniquement pour le groupe HFD, les femelles présentent une élévation de l'adiponectinémie. Ces résultats semblent être en accord avec plusieurs études réalisées autant sur des modèles murins que chez l'homme, qui affirment que les taux plasmatiques en adiponectine sont plus élevés chez les femelles que chez les mâles. La production de l'adiponectine serait donc également sous l'influence des hormones sexuelles (Kadowaki et al. 2006; Christou & Kiortsis 2014; Sweiss & Sharma 2014; Mauvais-Jarvis 2015). Dans ce sens, une étude propose que les taux d'adiponectine plasmatiques seraient sous le contrôle partiel des androgènes. En effet, les femmes hyper-androgéniques ont tendance à développer une hypo-adiponectinémie, mais la mise en place d'un traitement anti-androgénique permet l'augmentation des taux sériques d'adiponectine (Luque-Ramírez et al. 2013). Néanmoins, les hormones et les mécanismes impliqués restent à éclaircir.

L'adiponectine exerçant ses effets via ses deux récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2, leur expression a donc été évaluée. Dans cette étude, les expressions rénales d'ARNm codant pour les deux *récepteurs de l'adiponectine* suivent un profil similaire. Une légère tendance est observée, traduisant une diminution de leur expression avec un régime HFDF chez les mâles uniquement. Cette constatation ne permet toutefois pas de tirer de conclusion, même si elle reste en accord avec différentes études mettant en évidence une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour l'*AdipoR1* et l'*AdipoR2* dans les muscles et le tissu adipeux des souris Ob/Ob (Kadowaki et al. 2006; Rasmussen et al. 2006). De l'observation selon laquelle l'obésité réduit aussi bien les niveaux d'adiponectine plasmatique que l'expression de ses deux récepteurs, est apparue une hypothèse. Cette dernière propose que la réduction de la sensibilité à l'adiponectine observée lors de l'obésité, au vu de la diminution de l'expression de ses récepteurs, participe à l'induction de la résistance à l'insuline. Cette théorie semble d'autant plus cohérente que les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sont tous deux exprimés sur les cellules  $\beta$  du pancréas et pourraient donc jouer un rôle dans la sécrétion de l'insuline (Kadowaki et al. 2006). Une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour les *récepteurs de l'adiponectine* a également été mise en évidence chez les femelles par rapport aux mâles. Cette diminution



pourrait être le reflet de l'augmentation de l'expression de l'adiponectine observée chez les femelles. Néanmoins, cette théorie devra être validée dans le futur.

### 2.3. La chémérine

La chémérine, connue pour son rôle chémoattractant, serait également impliquée dans l'inflammation chronique liée à l'obésité. En effet, des études récentes ont montré que la chémérine pourrait jouer un rôle dans le développement de l'obésité et du syndrome métabolique (Bozaoglu et al. 2007; Jialal et al. 2013). Elle peut, comme l'adiponectine, avoir un impact sur l'homéostasie du glucose et, par conséquent, favoriser la résistance à l'insuline observée dans l'obésité (Fulop et al. 2014). Effectivement, une étude réalisée sur un modèle d'obésité induite par le régime, a mis en évidence que l'administration de chémérine recombinante exacerbe l'intolérance au glucose alors qu'elle n'a aucune influence sur l'utilisation du glucose chez les souris nourries avec un régime standard (Ernst et al. 2010). De par ses différentes fonctions, la chémérine semble donc jouer un rôle important dans l'inflammation et l'altération du métabolisme liée à l'obésité, mais des recherches plus approfondies sont nécessaires pour déterminer les mécanismes impliqués dans ce phénomène (Catalan et al. 2013). C'est dans cette optique que sa concentration plasmatique ainsi que ses niveaux d'expression en ARNm ont été évalués dans nos différents groupes expérimentaux. Comme le démontre l'étude de Catalan et al. (2013), sa concentration plasmatique devrait normalement augmenter avec un régime riche en graisse en lien avec l'augmentation de la taille des adipocytes et donc l'obésité. C'est également la tendance que l'on observe avec nos régimes riches en graisse, même si elle n'atteint pas toujours le seuil statistique. De plus, selon Fulop et al. (2014), sa concentration plasmatique devrait être corrélée positivement avec la leptine et l'obésité mais négativement avec l'adiponectine, ce qui ne semble être le cas que pour la leptine dans ce modèle. Néanmoins, une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour la *chémérine* avec un régime HFD et HFDF dans le tissu rénal a été observée chez les souris mâles alors qu'aucune différence n'a été mise en évidence chez les souris femelles. De plus, dans cette étude, il est clairement démontré que les femelles expriment moins la chémérine que les mâles, aussi bien au niveau plasmatique qu'au niveau de l'expression rénale de l'ARNm. Ces données concordent avec différentes études décrivant que les niveaux de chémérine sont positivement associés avec la quantité de graisse viscérale, principalement retrouvée chez les hommes et d'autant plus s'ils sont obèses, mais aussi avec une faible concentration plasmatique en œstradiol. De plus, il semblerait que les androgènes seraient impliqués dans la différence d'expression de la chémérine au niveau du tissu adipeux. En effet, des femmes présentant un syndrome des ovaires polykystiques, caractérisé par une élévation des androgènes, possèdent une expression de la chémérine similaire à celle observée chez les hommes (Neigh & Mitzelfelt 2016). Malgré cela, les mécanismes menant à cette différence restent très peu connus et nécessitent plus d'investigations.

Les rôles des récepteurs de la chémérine dans l'obésité demeurent largement inconnus, néanmoins quelques pistes semblent émerger. L'étude de Rourke et al. (2014) a démontré que GPR1 et CMKLR1 contribuent à la régulation de l'homéostasie du glucose dans l'obésité. En effet, dans cette étude, les souris knockout pour GPR1 ou CMKLR1 présentaient une altération de la consommation de nourriture résultant en une intolérance au glucose. Le récepteur CCLR2, quant à lui, aurait un rôle dans la concentration locale de la chémérine afin de la présenter à CMKLR1 (Yoshimura & Oppenheim 2011). Cependant, le mécanisme et l'impact de ces récepteurs dans la régulation de l'homéostasie du glucose et de la concentration de la chémérine restent non-élucidés. C'est pour cette raison qu'une évaluation de l'influence du genre et du régime sur l'expression des récepteurs de la chémérine a été effectuée. Dans ce modèle, une

augmentation de l'expression d'ARNm codant pour les *récepteurs de chémérine* (*CMKLR1*, *GPR1* et *CCLR2*) dans le tissu rénal est observée en lien avec la prise d'un régime riche en graisse, et ce quel que soit le sexe. Même si ces variations sont parfois légères, elles restent en cohérence avec d'autres études qui ont indiqué que l'expression d'ARNm codant pour les *récepteurs de la chémérine* augmente avec l'obésité dans de nombreux tissus (Ernst et al. 2010; Rourke et al. 2015). Il est donc possible qu'une variation de la concentration en chémérine liée à l'obésité puisse être observée dans le rein, mais aussi que l'impact au niveau rénal soit plus important qu'au niveau systémique. Effectivement, la chémérine pourrait se lier à ses récepteurs au niveau rénal et donc davantage impacter cet organe, menant à des perturbations de sa fonction. Toutefois, une investigation plus approfondie de cet aspect reste nécessaire pour confirmer cette hypothèse. Dans cette optique, un modèle de souris knockout pour les récepteurs de la chémérine pourrait être développé. La comparaison des souris knockout avec des souris wild-type pourrait donc mettre en évidence l'implication de la chémérine dans les mécanismes physiopathologiques liés à l'obésité. Une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour *CMKLR1* et *CCRL2* chez les souris femelles est observée lorsqu'on les compare avec les souris mâles suivant un régime riche en graisse, sans pour autant atteindre le seuil statistique. Cette variation pourrait être le reflet de celle de l'expression rénale de l'ARNm de la chémérine. En effet, la chémérine étant moins exprimée au niveau rénal, ses récepteurs pourraient compenser cette diminution en augmentant leur expression. Cette théorie doit cependant être encore validée, par exemple en administrant de la chémérine chez les souris femelles, afin de voir si les niveaux d'expression de ses récepteurs sont toujours plus élevés chez les femelles.

Enfin, de façon similaire aux résultats rapportés par Corona-Meraz et al. (2016), la concentration rénale en *CMKLR1* a tendance à augmenter avec un régime riche en graisse chez les mâles, même si nos résultats ne varient pas de façon significative. Ces chercheurs ont souligné que l'expression du récepteur *CMKLR1* était associée à la proportion de masse grasseuse abdominale et des dimensions corporelles et, par conséquent, à l'obésité (Rourke et al. 2015; Corona-Meraz et al. 2016). Ces résultats peuvent être partiellement expliqués par le fait que des stimuli pro-inflammatoires, tels que la régulation négative de la production de l'adiponectine et de l'insuline, seraient responsables de la sur-régulation de l'expression de *CMKLR1* dans les adipocytes (Catalan et al. 2013; Corona-Meraz et al. 2016). Dans notre modèle, les niveaux d'adiponectine sont inchangés entre les trois groupes mâles, cela pourrait donc expliquer que nous n'observons pas de différence significative pour l'expression de *CMKLR1* entre les différents régimes. La tendance inverse est observée chez les femelles avec une diminution de l'expression de *CMKLR1* chez les souris femelles nourries avec un régime riche en graisse, sans atteindre le seuil statistique. Cette constatation reste tout du moins surprenante au vu des résultats obtenus quant à son expression en ARNm, mais aussi à la littérature. Néanmoins, l'étude de Wargent et al. (2015), utilisant des souris knock-out aussi bien mâles que femelles pour le récepteur *CMKLR1*, montre que la déplétion de ce récepteur aurait tendance à rendre obèse ces souris, en plus d'altérer leur métabolisme du glucose, lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisse. À la lumière de ces résultats plutôt contradictoires, il apparaît nécessaire de réaliser d'autres analyses afin de comprendre les mécanismes sous-jacents et ainsi tirer de meilleures conclusions.



### 3. Évaluation de l'effet du régime et du genre sur l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose

#### 3.1. L'inflammation

L'inflammation et le stress oxydatif causés par l'obésité prennent une part importante dans la physiopathologie de l'obésité et ses conséquences. Cependant, les mécanismes complexes sous-jacents aux nombreuses pathologies associées, dont la résistance à l'insuline, restent à éclaircir (Koya & Kanasaki 2011). C'est dans cette optique que nous avons voulu caractériser l'inflammation induite par nos régimes riches en graisse, mais aussi l'impact du genre.

Une tendance à l'augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour *MCP-1* et *TNF- $\alpha$*  a été observée dans les groupes de souris nourries avec un régime riche en graisse, et ce, quel que soit le sexe. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans la littérature, qui affirment que la concentration plasmatique en MCP-1, en l'IL-6 et en TNF- $\alpha$  est augmentée lors de l'obésité. En effet, l'étude de Kanda et al. (2006) a également mis en évidence une augmentation des niveaux d'expression d'ARNm codant pour *MCP-1* et le *TNF- $\alpha$*  avec un régime riche en graisse dans un modèle murin. Cette étude émet également l'hypothèse que ces cytokines pourraient contribuer à l'infiltration des macrophages au sein des tissus et ainsi mener à l'inflammation. En réponse à l'hypertrophie et l'hyperplasie des adipocytes observées lors de l'obésité, se produit une inflammation du tissu adipeux résultant, entre autres, de l'hypoxie et la mort cellulaire des adipocytes. Cette inflammation induirait ensuite le recrutement et la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1, IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Kanda et al. 2006; Wozniak et al. 2009; Adamczak & Wiecek 2013; Felizardo et al. 2014). L'inflammation liée à l'obésité pourrait ainsi avoir un impact sur le tissu rénal et constituer une composante physiopathologique des maladies rénales chroniques. De plus, les concentrations plasmatiques en TNF- $\alpha$  seraient également positivement corrélées avec la résistance à l'insuline mais inversement corrélées avec les concentrations plasmatiques en adiponectine. L'impact modéré du régime sur l'expression d'ARNm codant pour le *TNF- $\alpha$*  au niveau rénal pourrait donc tirer son explication du fait que notre modèle ne présente qu'un faible impact sur la résistance à l'insuline ainsi que sur les concentrations plasmatiques en adiponectine. Par ailleurs, le TNF- $\alpha$  induisant la production de l'IL-6 et de MCP-1, ceci pourrait également justifier le faible impact du régime sur les niveaux d'expression de ces cytokines. En outre, seules les femelles semblent présenter une tendance à l'augmentation de l'expression d'ARNm codant pour l'IL-6 qui malgré tout n'atteint pas non plus le niveau statistique mais conduit tout de même à une différence inter-genre. Cette augmentation observée uniquement chez les femelles semble surprenante car une corrélation inverse entre les œstrogènes et les niveaux d'IL-6 est décrite. En effet, la ménopause causant une diminution des taux d'œstrogènes, augmenterait la production de l'IL-6 (Rachoń et al. 2002). Nos souris femelles, n'étant pas en ménopause, ne devraient pas présenter cette augmentation. Néanmoins, nous avons évalué l'expression d'ARNm codant pour l'IL-6, des régulations post-transcriptionnelle peuvent donc avoir lieu et ce de façon plus importante chez les femelles. L'évaluation des concentrations rénales en IL-6 pourrait donc éclaircir cette interrogation.

Finalement, le nombre de macrophages présents au sein du tissu rénal ne semble pas évoluer avec un régime riche en graisse, et ne présente pas non plus de variation causée par le genre. Ces résultats ne nous permettent pas de confirmer une atteinte inflammatoire du tissu rénal liée à l'obésité, mais ils ne nous permettent pas de l'exclure non plus. Il serait donc nécessaire d'approfondir ces analyses afin d'en apprendre davantage sur le phénomène inflammatoire.



Une évaluation des concentrations rénales et plasmatiques de ces cytokines pro-inflammatoires, ainsi que l'infiltration d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes, présenterait un bon point de départ. Ces données restent donc cohérentes avec une inflammation induite par un régime riche en graisse mais qui resterait modérée ou se trouverait toujours à un stade précoce. La mise en place d'un protocole plus long pourrait peut-être permettre de répondre à cette question. Une autre option consisterait à effectuer des prises de sang fréquentes afin d'évaluer la concentration plasmatique en cytokines au cours du temps et donc l'évolution de l'inflammation.

### 3.2. Le stress oxydatif

L'obésité est associée à un stress oxydatif, de par l'augmentation de la production de ROS et de par la diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes, et ce, aussi bien chez l'homme que chez la souris. La production d' $H_2O_2$  peut avoir un impact sur le stress oxydatif, au vue de sa capacité à être réduit et ainsi former des radicaux libres (Furukawa et al. 2004; Coyle et al. 2006; Ostrow et al. 2011). Dans cette étude, seuls les mâles nourris avec un régime HFD semblent être impactés. Ce résultat suit les constatations de l'étude de Correia-Costa et al. (2016) démontrant une augmentation du peroxyde d'hydrogène urinaire et donc du statut oxydant en relation avec l'accumulation de tissu graisseux. Cette augmentation de la production d' $H_2O_2$  urinaire suggère donc un stress oxydatif au niveau du tissu rénal. Les femelles, quant à elles, présentant une plus faible accumulation ectopique de graisse au niveau des reins et présentent donc une lipotoxicité moindre que les mâles. Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi ces femelles présentent une excrétion urinaire en  $H_2O_2$  plus faible, mais cette hypothèse doit encore être validée.

Les NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidases, ou NOX, sont des sources importantes de ROS, dont le peroxyde d'hydrogène. Parmi les différentes isoformes de NOX, trois pourraient participer au stress oxydatif contribuant aux maladies rénales chroniques ; NOX1, NOX2 et NOX4 (Takac et al. 2012; Sharma 2014). De fait, NOX4 est désormais considérée comme un facteur clé dans le développement de l'inflammation associée aux néphropathies diabétiques de type II (Sharma 2014). Nos résultats suggèrent que les mâles subissent peu l'influence du régime quant à l'expression relative de ces trois NOX. Deux acteurs, dont la sécrétion est influencée lors de l'obésité pourraient modifier l'incidence du stress oxydatif ; le TNF- $\alpha$  et l'adiponectine. Effectivement, le TNF- $\alpha$  augmenterait l'expression des NOX, même si le mécanisme sous-jacent n'a pas encore été élucidé. L'augmentation de la production des ROS pourrait également être induite par une diminution de la sécrétion en adiponectine observée lors de l'obésité (Furukawa et al. 2004; Takac et al. 2012). Le régime pourrait donc ne jouer qu'une petite influence sur l'expression de ces trois NOX en raison de son faible impact sur le TNF- $\alpha$  et l'adiponectine. À l'opposé, les femelles nourries avec un régime riche en graisse semblent être davantage impactées, même si l'augmentation observée ne rejoint jamais le seuil statistique. Cette sur-expression des différentes NOX suggère une accumulation de la production de ROS dans ce tissu en réponse au régime. Nos résultats n'étant pas significatifs, ils ne permettent cependant pas de tirer de réelle conclusion, mais reste en accord avec la littérature (Furukawa et al. 2004; Holterman et al. 2015). Par exemple, l'étude de Gorin et al. (2005) a montré que l'expression protéique de NOX4 est augmentée dans le cortex rénal d'un rein de diabétique, mais que l'administration d'un inhibiteur des NOX prévenait la génération d'oxydants produits par les NOX dans le cortex rénal, les glomérules et les cellules mésangiales en culture. De plus, une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour *NOX1* chez les femelles nourries avec un régime HFD a été constatée, alors qu'il existe une diminution de l'expression de NOX2. Nos résultats se retrouvent donc en partie en

contradiction avec l'étude de Wong et al. (2015). En effet, cette dernière démontre que l'expression des protéines NOX1 et NOX2 dans des artères coronaires isolées de porcs est plus grande chez les mâles par rapport aux femelles, alors que c'est l'inverse pour NOX4. En revanche, cette étude s'intéresse aux concentrations protéines et non à l'expression de l'ARNm de ces *trois NOX*. Une régulation post-transcriptionnelle pourrait donc s'opérer et expliquer les différences obtenues avec nos résultats. De plus, Wong et al. (2015) ont travaillé sur un modèle *in vitro* et de surcroît sur un animal d'une autre espèce. Cet aspect pourrait donc également influencer les résultats obtenus et expliquer ces résultats contradictoires.

### 3.3. La fibrose

La fibrose, causée par un dépôt excessif de matrice extracellulaire, est en réalité la réponse physiologique à une inflammation chronique, comme celle observée dans l'obésité (Divoux et al. 2010). En effet, l'exposition chronique du tissu rénal à un dépôt lipidique est capable de mener à terme à l'activation des voies inflammatoires et pro-fibrotiques. Ces deux voies induiraient par la suite l'activation des NOX et du TGF- $\beta$ , contribuant ainsi directement à l'entretien de l'inflammation et au développement de la fibrose du tissu rénal (Sharma 2014). Effectivement, il a été démontré que l'augmentation de l'expression du TGF- $\beta$  contribue à l'inflammation et la fibrose du tissu rénal. Le TGF- $\beta$  est en réalité un facteur clé dans la régulation de la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire rénale. Sa surexpression induit une expansion de la matrice mésangiale ainsi qu'une glomérulosclérose. L'expression de son ARNm par les cellules mésangiales tend à augmenter lors d'une néphropathie diabétique (Lee 2011). Ces données vont donc dans le sens de celles obtenues dans notre étude où une élévation de l'expression d'ARNm codant pour le TGF- $\beta$  est également observée chez les souris suivant un régime riche en graisse, et de façon plus importante chez les femelles. Une élévation de l'expression d'ARNm codant pour le *collagène de type I et III* a également été observée en lien avec un apport riche en graisse, et de façon plus importante chez les femelles. L'expression plus importante du TGF- $\beta$  pourrait expliquer la surexpression du collagène de type I et III retrouvée chez les femelles. Il semblerait que l'hypoxie induirait également une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour le *collagène de type I et III*. En effet, ces paramètres voient leur expression diminuer lorsqu'on utilise un inhibiteur de HIF-1, chez des souris nourries avec un régime HFD, améliorant ainsi la fibrose du tissu adipeux (Buechler et al. 2015). Ces résultats pourraient donc également expliquer pourquoi l'expression d'ARNm codant pour le *collagène de type I et III* est augmentée avec les régimes riches en graisse dans ce modèle. Des études plus récentes ont également suggéré que la leptine serait largement impliquée dans la fibrose rénale. En effet, l'administration de leptine chez des rats serait capable d'induire la production du TGF- $\beta$  et du collagène de type I, accompagnée par une protéinurie et une prolifération des cellules endothéliales glomérulaires (Adamczak & Wiecek 2013; Felizardo et al. 2014). Néanmoins son mécanisme d'action reste peu connu et nécessite donc des études supplémentaires. Dans notre étude, le niveau d'expression d'ARNm codant pour la *périostine* tend à augmenter avec un régime riche en graisse. Cette protéine, exprimée dans les compartiments tubulo-interstitiels et fibrotiques, a une très faible expression rénale chez les animaux en bonne santé, mais son expression augmente significativement au cours du développement des lésions et de la fibrose (Mael-Ainin et al. 2014; Satirapoj et al. 2015).

En outre, une coloration au rouge picosirius, qui met en évidence les fibres de collagène I et III et donc les plages de fibrose, a été réalisée. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence le développement d'une fibrose induite par un régime riche en graisse, et ce malgré une tendance observée aussi bien chez les mâles que les femelles. Nos résultats n'étant pas significatifs, ils ne permettent pas de tirer des conclusions quant à un lien



entre la fibrose et l'obésité mais restent tout du moins cohérents avec d'autres études antérieures observant le développement d'une fibrose dans le cadre de l'obésité (Divoux et al. 2010; Prasad 2014; Buechler et al. 2015).

### 4. Conclusions

En résumé, la dérégulation des adipokines produites par les adipocytes jouerait un rôle central dans le développement de maladies associées à l'obésité, mais leur rôle précis n'a pas encore été clairement élucidé (Furukawa et al. 2004). Dans cette étude, nous avons mis en place un modèle murin d'obésité induit par un régime riche en graisse. Nous avons tenté de mettre en évidence l'impact des régimes HFD et HFDF et du genre sur la dérégulation des adipokines, en mettant l'accent sur l'adiponectine, la leptine et la chémérine. Cependant, compte tenu de nos résultats, il semble évident que notre modèle d'obésité induit par un régime riche en graisse possède un impact modéré sur les fonctions rénales et les paramètres métaboliques, malgré l'augmentation relative du PC, l'accumulation ectopique de graisse dans le rein, la glomérulosclérose et les lésions tubulaires. De plus, nous avons observé peu de variation entre les trois régimes en ce qui concerne la chémérine et l'adiponectine plasmatique. Seule la leptine montre une influence directe du régime sur sa concentration plasmatique. Cette constatation peut également s'étendre à l'impact du régime sur le stress oxydatif, l'inflammation et la fibrose rénale. Plusieurs facteurs peuvent avoir influencés ces résultats. Premièrement, l'obésité est un syndrome chronique dont les effets sont très variables entre les individus. Comme chez les humains, il existe une très grande variabilité inter-individuelle chez la souris, ce qui peut conduire au développement d'une obésité non symptomatique (Mori et al. 2009). Cette hypothèse peut expliquer pourquoi dans beaucoup de nos résultats, nous observons une tendance qui n'atteint pas une signification statistique. En effet, la taille de l'échantillon serait trop petite pour mettre en évidence une différence significative. En outre, étant donné que les maladies liées à l'obésité sont des pathologies qui se développent sur le long terme, on peut suggérer que la durée du traitement peut être trop courte pour observer un impact du régime sur le tissu rénal (Eknoyan 2011; Nashar & Egan 2014; Prasad 2014). Dans ce cas, un traitement plus long pourrait résoudre ce problème. Par contre, nous avons pu mettre en évidence un vaste impact du genre quant aux effets de l'obésité sur la fonction urinaire et la fibrose, mais aussi les caractéristiques systémiques, comme l'expression des adipokines et leurs récepteurs, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires. Dans la plupart de ces résultats, les femelles semblent être protégées de l'impact de l'obésité induite par le régime. Les hormones sexuelles, telles que l'œstradiol et les androgènes, semblent donc avoir une place importante dans la physiopathologie de l'obésité. Toutefois, leur implication et les mécanismes d'action restent à élucider.

Il existe de nombreuses perspectives, comme celles déjà évoquées lors de cette discussion. Mais d'autres sont également envisageables. Par exemple, un autre projet de recherche serait l'utilisation de souris knock-out pour le gène de l'adiponectine afin de se concentrer sur la relation entre l'adiponectine et la chémérine, mais aussi avec la résistance à l'insuline dans l'obésité induite par un régime hypercalorique. Des niveaux faibles en adiponectine étant corrélés avec un plus grand risque de développer une résistance à l'insuline, il serait intéressant d'utiliser un traitement composé des agonistes des récepteurs AdipoR1 et/ou AdipoR2. Cette méthode pourrait ainsi fournir une approche pour l'étude de la résistance à l'insuline. Dans toutes les perspectives fournies précédemment, il serait également intéressant de déterminer si le genre aurait une influence sur ces paramètres. Enfin, il serait également judicieux de regarder si l'impact lié au régime riche en graisse est réversible, tout du moins en partie, lorsque ces mêmes souris seraient ensuite nourries avec un régime LFD.



# **Bibliographie**

- Abrass, C.K., 1995. Diabetic nephropathy : Mechanisms of mesangial matrix expansion. *The Western journal of medicine*, 162(4), pp.318–321.
- Adamczak, M. & Wiecek, A., 2013. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Seminars in Nephrology*, (February 2013), pp.229–237.
- Alfadda, A.A., 2014. Circulating adipokines in healthy versus unhealthy overweight and obese subjects. *International Journal of Endocrinology*, 2014.
- Angelica, M.D. & Fong, Y., 2008. Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver. *Mol Cell Endocrinol.*, 141(4), pp.520–529.
- Asarian, L. & Geary, N., 2013. Sex differences in the physiology of eating. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 305(11), pp.R1215–67.
- Bondue, B., Wittamer, V. & Parmentier, M., 2011. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(5–6), pp.331–338.
- Bonomini, M. & Pandolfi, A., 2015. Chemerin in renal dysfunction and cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 77, pp.28–34.
- Boron, W. & Boulpaep, E., 2012. *Medical Physiology* Second Edi. I. Elsevier, ed.,
- Bozaoglu, K. et al., 2007. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, 148(10), pp.4687–4694.
- Brown, L. & Clegg, D., 2010. Central Effects of Estradiol in the Regulation of Adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 122((1-3)), pp.65–73.
- Bruce, K.D. & Byrne, C.D., 2009. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgraduate medical journal*, 85(1009), pp.614–21.
- Buechler, C., Krautbauer, S. & Eisinger, K., 2015. Adipose tissue fibrosis. *World journal of diabetes*, 6(4), pp.548–53.
- Catalan, V. et al., 2013. Increased levels of chemerin and its receptor, chemokine-like receptor-1, in obesity are related to inflammation: tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates mRNA levels of chemerin in visceral adipocytes from obese patients. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 9(2), pp.306–314.
- Chagnac, a et al., 2000. Glomerular hemodynamics in severe obesity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 278(5), pp.F817–F822.
- Chen, Y.-W. et al., 2011. Renal function in patients with liver cirrhosis. *Nephron. Clinical practice*, 118(2), pp.c195–c203.
- Christou, G.A. & Kiortsis, D.N., 2014. The role of adiponectin in renal physiology and development of albuminuria. *The Journal of endocrinology*, 221(2).
- Chu, S.H. et al., 2012. Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *PLoS ONE*, 7(4).
- Corona-Meraz, F.-I. et al., 2016. Inverse Relationship of the CMKLR1 Relative Expression and Chemerin Serum Levels in Obesity with Dysmetabolic Phenotype and Insulin Resistance. *Mediators of Inflammation*, 2016.

- Correia-Costa, L. et al., 2016. Oxidative stress and nitric oxide are increased in obese children and correlate with cardiometabolic risk and renal function. *British Journal of Nutrition*.
- Coyle, C.H. et al., 2006. Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(12), pp.2206–2213.
- Declèves, A. et al., 2014. Regulation of lipid accumulation by AMK-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney International*, 85(3), pp.611–623.
- Dissard, R. et al., 2013. Long Term Metabolic Syndrome Induced by a High Fat High Fructose Diet Leads to Minimal Renal Injury in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE*, 8(10), pp.1–14.
- Divoux, A. et al., 2010. Fibrosis in Human Adipose Tissue : Composition , Distribution , and Link With Lipid Metabolism and Fat. *Diabetes*, 59(November), pp.2817–2825.
- Eknoyan, G., 2011. Obesity and chronic kidney disease. *Nefrología*, 31(4), pp.397–403.
- Ernst, M.C. et al., 2010. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. *Endocrinology*, 151(5), pp.1998–2007.
- Ernst, M.C. et al., 2012. Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. *Endocrinology*, 153(2), pp.672–682.
- Ernst, M.C. & Sinal, C.J., 2010. Chemerin: At the crossroads of inflammation and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(11), pp.660–667.
- Fatima, S.S. et al., 2014. New roles of the multidimensional adipokine: Chemerin. *Peptides*, 62, pp.15–20.
- Felizardo, R.J.F. et al., 2014. Obesity in kidney disease: A heavyweight opponent. *World journal of nephrology*, 3(3), pp.50–63.
- Fishman, S. et al., 2007. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *The FASEB journal*, 21(1), pp.53–60.
- Flegal, K.M. et al., 2014. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. *JAMA*.
- Fulop, P. et al., 2014. Association of chemerin with oxidative stress, inflammation and classical adipokines in non-diabetic obese patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(7), pp.1313–1320.
- Furukawa, S. et al., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), pp.1752–1761.
- Gil-Campos, M., Cañete, R. & Gil, A., 2004. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clinical Nutrition*, 23(5), pp.963–974.
- Goralski, K.B. et al., 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), pp.28175–28188.
- Gorin, Y. et al., 2005. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), pp.39616–39626.



- Goumenos, D.S. et al., 2009. Early histological changes in the kidney of people with morbid obesity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(12), pp.3732–3738.
- Gui, Y., Silha, J. V & Murphy, L.J., 2004. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obesity research*, 12(9), pp.1481–1491.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E., 2006. *Medical Physiology* Eleventh E., Elsevier Inc.
- Hammond, K.A. & Janes, D.N., 1998. The effects of increased protein intake on kidney size and function. *The Journal of experimental biology*, 201(13), pp.2081–2090.
- Hariri, N. & Thibault, L., 2010. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*, 23(2), pp.270–99.
- Hill, J.O., Melanson, E.L. & Wyatt, H.T., 2000. Dietary Fat Intake and Regulation of Energy Balance: Implications for Obesity. *Journal of Nutrition*, 130, pp.272–275.
- Himms-Hagen, J., 1999. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 36(6), pp.575–655.
- Holterman, C.E., Read, N.C. & Kennedy, C.R.J., 2015. Nox and renal disease. *Clinical Science*, 128, pp.465–481.
- Hosogai, N. et al., 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56(4), pp.901–911.
- Huang, C. et al., 2016. CMKLR1 deficiency influences glucose tolerance and thermogenesis in mice on high fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Ingelfinger, J.R., 2003. Is Microanatomy Destiny? *The New England Journal of Medicine*, pp.97–100.
- Jialal, I. et al., 2013. Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(3), pp.514–517.
- Kadowaki, T. et al., 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance , diabetes , and the metabolic syndrome. *The journal of clinical investigation*, 116(7), pp.1784–1792.
- Kalaitzidis, R.G. & Siamopoulos, K.C., 2011. The role of obesity in kidney disease: Recent findings and potential mechanisms. *International Urology and Nephrology*, 43(3), pp.771–784.
- Kambham, N. et al., 2001. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. *Kidney International*, 59(4), pp.1498–1509.
- Kanasaki, K. & Koya, D., 2011. Biology of Obesity : Lessons from Animal Models of Obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Kanda, H. et al., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6).
- Kaur, J., 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Reasearch and Practice*, 2014.

- Kelly, T. et al., 2008. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity (2005)*, 32(9), pp.1431–7.
- Klunder-Klunder M et al., 2013. Adiponectin in eutrophic and obese children as a biomarker to predict metabolic syndrome and each of its components. *BMC Public Health*, pp.2–9.
- Koya, D. & Kanasaki, K., 2011. Biology of obesity: Lessons from animal models of obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Kukla, M. et al., 2011. Potential Role of Leptin, Adiponectin and Three Novel Adipokines—Visfatin, Chemerin and Vaspin—in Chronic Hepatitis. *Molecular Medicine*, 17(11–12), p.1.
- Kukla, M. & Mazur, W., 2014. Hepatic chemerin and chemokine-like receptor 1 expression in patients with chronic hepatitis C. *Molecular Medicine*.
- Kume, S. et al., 2007. Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(10), pp.2715–2723.
- Laville, M., 2011. Renal consequences of obesity. *Nephrologie et Therapeutique*, 7(2), pp.80–85.
- Lea, J. et al., 2008. Metabolic Syndrome, Proteinuria, and the Risk of Progressive CKD in Hypertensive African Americans. *American Journal of Kidney Diseases*, 51(5), pp.732–740.
- Lee, H.S., 2011. Role of TGF- $\beta$  in Mesangial Matrix Accumulation in Chronic Progressive Glomerular Disease. *An Update on Glomerulopathies - Etiology and Pathogenesis*, (Lee), pp.123–139.
- Lewis, R., 2012. *Understanding Chronic Kidney Disease: A guide for the non-specialist* M&K Publishing, ed.,
- Li, Y., Shi, B. & Li, S., 2014. Association between serum chemerin concentrations and clinical indices in obesity or metabolic syndrome: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 9(12), pp.1–14.
- Li, Z. et al., 2011. Increased glomerular filtration rate in early metabolic syndrome is associated with renal adiposity and microvascular proliferation. *American journal of physiology. Renal physiology*, 301(5), pp.F1078–87.
- Lovejoy, J.C. & Sainsbury, A., 2009. Sex differences in obesity and the regulation of energy homeostasis. *Obesity Reviews*, 10(2), pp.154–167.
- Luque-Ramírez, M. et al., 2013. Sexual dimorphism in adipose tissue function as evidenced by circulating adipokine concentrations in the fasting state and after an oral glucose challenge. *Human Reproduction Advanced*, 28(4), pp.1908–1918.
- Ma, L.J. et al., 2011. Angiotensin type 1 receptor modulates macrophage polarization and renal injury in obesity. *AJP: Renal Physiology*, 300(5), pp.F1203–F1213.
- Maeda, N. et al., 2001. PPAR $\gamma$  ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an Adipose-Derived Protein. *Diabetes*, 50(September), pp.2094–2099.
- Mael-Ainin, M. et al., 2014. Inhibition of Periostin Expression Protects against the

- Development of Renal Inflammation and Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, pp.1–13.
- De Matteis, R. et al., 1998. Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57(3), pp.441–448.
- Mattern, A., Zellmann, T. & Beck-Sickinger, A.G., 2014. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life*, 66(1), pp.19–26.
- Mauvais-Jarvis, F., 2015. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biology of sex differences*, 6, p.14.
- Mayes, J. & Watson, G., 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity reviews*, (2), pp.197–216.
- Meyer, M.R. et al., 2012. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of estrogen receptors. *Acta Physiol (oxf)*, 203(1), pp.259–269.
- Monnier, J. et al., 2012. Expression, Regulation, and Function of Atypical Chemerin Receptor CCRL2 on Endothelial Cells. *The Journal of Immunology*, 189(2), pp.956–967.
- Mori, M. et al., 2009. Genetic basis of inter-individual variability in the effects of exercise on the alleviation of lifestyle-related diseases. *The Journal of physiology*, 587(Pt 23), pp.5577–84.
- Nakamura, K., Fuster, J.J. & Walsh, K., 2014. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of cardiology*, 63(4), pp.250–259.
- Nakayama, T. & Wang, Z., 2010. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators of Inflammation*, 2010.
- Nashar, K. & Egan, B., 2014. Relationship between chronic kidney disease and metabolic syndrome: current perspectives. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, p.421.
- Neigh, G. & Mitzelfelt, M., 2016. *Sex Differences in Physiology* A. Press, ed., Academic Press.
- O'Neill, S. et al., 2016. Blood-Based Biomarkers for Metabolic Syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, pp.1–12.
- Ostrow, V. et al., 2011. Association between oxidative stress and masked hypertension in a multi-ethnic population of obese children and adolescents. *Journal of Pediatrics*, 158(4), p.628–633.e1.
- De Palma, G. et al., 2011. The possible role of ChemR23/Chemerin axis in the recruitment of dendritic cells in lupus nephritis. *Kidney international*, 79(11), pp.1228–1235.
- Palmer, B.F. & Clegg, D.J., 2015. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol.*, pp.113–119.
- Parlee, S.D. et al., 2010. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology*, 151(6), pp.2590–2602.
- Perri, A. et al., 2013. Adiponectin is expressed and secreted by renal tubular epithelial cells. *Journal of Nephrology*, 26(6), pp.1049–1054.



- Pettersson, U.S. et al., 2012. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PloS one*, 7(9), p.e46057.
- Pinilla, L. et al., 1999. Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. *European journal of endocrinology*, 140(5), pp.468–73.
- Power, M.L. & Schulkin, J., 2008. Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. *British Journal of Nutrition*, 99(5), pp.931–940.
- Pradhan, A.D., 2014. Sex differences in the metabolic syndrome: Implications for cardiovascular health in women. *Clinical Chemistry*, 60(1), pp.44–52.
- Praga, M. et al., 2000. Influence of obesity on the appearance of proteinuria and renal insufficiency after unilateral nephrectomy. *Kidney International*, 58(5), pp.2111–2118.
- Prasad, G.V.R., 2014. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions. *World Journal of Nephrology*, 3(4), pp.210–219.
- Rabe, K. & Lehrke, M., 2008. Adipokines and Insulin Resistance. *Molecular Medicine*, 14(11–12), p.1.
- Rachoń, D. et al., 2002. Effects of oestrogen deprivation on interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells of postmenopausal women. *Journal of Endocrinology*, 172(2), pp.387–395.
- Rasmussen, M.S. et al., 2006. Adiponectin receptors in human adipose tissue: Effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity*, 14(1), pp.28–35.
- Ress, C. & Kaser, S., 2016. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World journal of gastroenterology*, 22(4), pp.1664–73.
- Ricardo, S.D., Van Goor, H. & Eddy, A.A., 2008. Macrophage diversity in renal injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), pp.3522–3530.
- Roh, S. gun et al., 2007. Chemerin-A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(4), pp.1013–1018.
- Roman, A.A., Parlee, S.D. & Sinal, C.J., 2012. Chemerin: A potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine*, 42(2), pp.243–251.
- Rosini, T.C., Sanchez Ramos Da Silva, A. & De Moraes, C., 2012. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 58, pp.383–7.
- Rossmesl, M. et al., 2003. Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes*, 52(8), pp.1958–66.
- Rourke, J.L. et al., 2014. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *Journal of Endocrinology*, 222(2), pp.201–215.
- Rourke, J.L., Dranse, H.J. & Sinal, C.J., 2015. CMKLR1 and GPR1 mediate chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 417, pp.36–51.

- Ruan, X. & Guan, Y., 2009. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Journal of diabetes*, 1(4), pp.236–245.
- Saad, M.F. et al., 1997. Sexual Dimorphism in Plasma Leptin Concentration \*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(2), pp.579–584.
- Satirapoj, B. et al., 2015. Periostin as a tissue and urinary biomarker of renal injury in type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE*, 10(4), pp.1–10.
- Schulz, L.C. & Widmaier, E.P., 2007. Leptin receptors. *Springer*.
- Seely, J.C. & Brix, A., 2005. Kidney – Introduction. *Toxicology of the Kidney*, (Figure 1), pp.1–10.
- Serra, A. et al., 2008. Renal injury in the extremely obese patients with normal renal function. *Kidney international*, 73(8), pp.947–55.
- Shah, S. V et al., 2007. Oxidants in Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18(1), pp.16–28.
- Sharma, K., 2014. Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease. *Kidney international supplements*, 4(1), pp.113–117.
- Shi, H. & Clegg, D.J., 2009. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology & behavior*, 97(2), pp.199–204.
- Silverthorn, D.U., Silverthorn, A.C. & Johnson, B.R., 2007. *Physiologie humaine : Une approche intégrée* 4e édition. Pearson education, ed., Pearson education.
- Smith, J.T. & Waddell, B.J., 2003. Developmental changes in plasma leptin and hypothalamic leptin receptor expression in the rat: peripubertal changes and the emergence of sex differences. *Journal of Endocrinology*, 176(3), pp.313–319.
- Stenvinkel, P., Lönnqvist, F. & Schalling, M., 1999. Molecular studies of leptin: Implications for renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14(5), pp.1103–1112.
- Suzuki, Y. et al., 2012. The regulation of chemerin and CMKLR1 genes expression by TNF- $\alpha$ , adiponectin, and chemerin analog in bovine differentiated adipocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(9), pp.1316–1321.
- Sweiss, N. & Sharma, K., 2014. Adiponectin effects on the kidney. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 28(1), pp.71–79.
- Takac, I., Schröder, K. & Brandes, R.P., 2012. The nox family of NADPH Oxidases: Friend or foe of the vascular system? *Current Hypertension Reports*, 14(1), pp.70–78.
- Varlamov, O., Bethea, C.L. & Roberts, C.T., 2014. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 5(DEC), pp.1–7.
- Van De Voorde, J. et al., 2013. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism*.
- Wang, H., Ran, J. & Jiang, T., 2014. Urea. *Subcellular Biochemistry*, pp.7–29.
- Wang, Q.A. et al., 2013. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medecine*, 19(10), pp.1338–1344.
- Wargent, E.T. et al., 2015. Evidence from studies in rodents and in isolated adipocytes that

- agonists of the chemerin receptor CMKLR1 may be beneficial in the treatment of type 2 diabetes. *PeerJ*, 3, p.e753.
- White, U.A. & Tchoukalova, Y.D., 2014. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta.*, 1842(3), pp.377–392.
- Wick, L.F., 1941. Sex and Proteinuria of Mice. *Experimental Biology and Medicine*, pp.395–400.
- Winzell, M.S. & Ahren, B., 2004. The High-Fat Diet–Fed Mouse: A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 53, pp.S215–219.
- Wolf, G. et al., 2002. Leptin and renal disease. *American journal of kidney diseases*, 39(1), pp.1–11.
- Wolf, G. et al., 1999. Leptin stimulates proliferation and TGF- $\beta$  expression in renal glomerular endothelial cells: Potential role in glomerulosclerosis. *Kidney International*, 56(3), pp.860–872.
- Wong, P.S., Randall, M.D. & Roberts, R.E., 2015. Sex differences in the role of NADPH oxidases in endothelium-dependent vasorelaxation in porcine isolated coronary arteries. *Vascular Pharmacology*, 72, pp.83–92.
- World Health Organization, 2016. Obesity and overweight. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Wozniak, S.E. et al., 2009. Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(9), pp.1847–1856.
- Yadav, A. et al., 2013. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta*, 417, pp.80–84.
- Yiannikouris, F. et al., 2012. Adipokines and Blood Pressure Control. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 19(2), pp.195–200.
- Yoshimura, T. & Oppenheim, J.J., 2011. Chemokine-like Receptor 1 (CMKLR1) and Chemokine (C-C motif) Receptor-like 2 (CCRL2); Two Multifunctional Receptors with Unusual Properties. *Exp Cell Res.*, 317(5), pp.674–684.
- Zabel, B.A. et al., 2008. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med*, 205(10), pp.2207–2220.
- Ziemke, F. & Mantzoros, C.S., 2010. Adiponectin in insulin resistance: Lessons from translational research. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(1), pp.258–261.